

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

### **⓪ BLACK BORDERS**

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES

### **⓪ COLORED PHOTOS**

- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 novembre 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/088338 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 7/00,  
15/51, 5/16, C12Q 1/00

(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Gros-  
set-Fournier & Demachy Sarl, 20, rue de Maubeuge,  
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01422

(22) Date de dépôt international : 25 avril 2002 (25.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/05732 27 avril 2001 (27.04.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cédex 16 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
WYCHOWSKI, Czeslaw [FR/FR]; 4, rue de la Rigole  
du Roy, Résidence les Près, F-62410 Meurchin (FR).  
DUVERLIE, Gilles [FR/FR]; 458, rue Saint\_Fuscien,  
F-80090 Amiens (FR). DUBUISSON, Jean [BE/FR];  
80, avenue de Verdun, F-59155 Faches-Thumesnil (FR).  
PILLEZ, André [FR/FR]; 281/37, rue Solférino, F-59000  
Lille (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR REPLICATING THE HEPATITIS C VIRUS

(54) Titre : PROCEDE DE REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C

(57) Abstract: The invention concerns the use of cells capable of carrying out a process of prenylation of proteins coded by the hepatitis C virus (HCV) genome, such as prenylation of the NS5A protein, for replicating and, if required, the production of HCV or derivative viable mutants, in a suitable culture medium.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de cellules capables d'effectuer un processus de prénylation de protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C (VHC), telle que la prénylation de la protéine NS5A, pour la réplication et, le cas échéant, la production du VHC ou de mutants viables dérivés, dans un milieu de culture approprié.

WO 02/088338 A2

## PROCÉDÉ DE RÉPLICATION DU VIRUS DE L'HÉPATITE C

L'invention concerne un procédé de réplication du virus de l'hépatite C. L'invention concerne également un procédé de criblage d'inhibiteurs du virus de l'hépatite C.

Le virus de l'hépatite C ou VHC, identifié en 1989 par l'équipe de Choo (Choo et al., 1989), est l'agent majeur des infections virales appelées pendant longtemps hépatites non-A non-B. La terminologie "non-A non-B" a été introduite dans les années 70 pour désigner les hépatites dont les agents étiologiques, non encore identifiés, apparaissent sérologiquement distincts des hépatites A et B, grâce à la mise en place des tests immunologiques (Feinstone et al., 1975 ; Prince et al., 1974).

Sur le plan clinique, l'infection par le virus de l'hépatite C est caractérisée par une forte prédominance des formes asymptomatiques et la fréquence de l'évolution vers la chronicité.

Le clonage moléculaire et le séquençage du virus de l'hépatite C ont été initialement réalisés par Choo et al. (1988 et 1989) et confirmés par d'autres équipes (Kato et al., 1990 ; Okamoto et al., 1992 ; Inchauspé et al., 1991). L'analyse séquentielle du génome du VHC révèle une phase ouverte de lecture unique dont l'AUG initiateur se trouve en position 342 du génome. Comme pour certains virus à ARN positif, la région 5' non codante du VHC est impliquée dans le processus d'initiation de la traduction par la présence d'un site interne d'entrée des ribosomes ou IRES (Tsukiyama-Kohara et al., 1992 ; Reynolds et al., 1995).

La construction d'un ADNc codant pour la totalité de la polyprotéine du virus de l'hépatite C, et son expression dans divers vecteurs procaryotes ou eucaryotes, ont permis de préciser l'organisation du génome, et de caractériser les diverses protéines issues de la maturation de la polyprotéine. Différents processus de clivage de cette polyprotéine, impliquant des protéases virales et cellulaires, génèrent les protéines structurales et non structurales. Des études de traduction in vitro et d'expression in vivo (Grakoui et al., 1993 ; Hijikata et al., 1991) ont permis d'établir l'ordre dans lequel les protéines sont codées par le génome et qui est schématisé comme suit : H<sub>2</sub>N-C-E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH.

Le premier tiers du génome de l'hépatite C code pour les protéines structurales C, E1, E2 et p7. Les différentes protéines de la région structurale sont le résultat de l'implication de protéases d'origine cellulaire.

La protéine C, d'un poids moléculaire d'environ 21 kDa, contenant 173 acides aminés, est la protéine de capsid. Cette protéine est le principal constituant de la nucléocapside du VHC. La région carboxy-terminale localisée entre les acides aminés 174 à 191 constitue le peptide signal de la glycoprotéine E1. Cette séquence est clivée par une signalase. La protéine de capsid C, de composition très basique, en raison de sa richesse en acides aminés arginine et lysine (23,5% des acides aminés dans la région N-terminale) pourrait être impliquée dans les interactions ARN-protéines.

Les glycoprotéines E1 et E2, de poids moléculaires respectifs 31 et 70 kDa, constituent les glycoprotéines d'enveloppe. Ce sont des glycoprotéines membranaires de type I, elles présentent chacune à leur extrémité carboxy-terminale un domaine hydrophobe. En outre elles possèdent chacune une séquence signal hydrophobe à l'extrémité N-terminale permettant une translocation dans le réticulum endoplasmique et une maturation de ces protéines par des signalases cellulaires. Les acides aminés compris entre 174-191 et les acides aminés compris entre 371-383 de la polyprotéine du VHC correspondent aux peptides signaux des glycoprotéines E1 et E2. Le dernier acide aminé de la séquence de E2 est situé en position 746 de la polyprotéine du VHC et le dernier acide aminé de la glycoprotéine de E1 est en position 383 de la polyprotéine ce qui implique que le peptide signal de la glycoprotéine E2 fait partie intégrante de E1.

Entre E2 et la protéine NS2, on a identifié une petite protéine p7, dont on ignore encore la fonction.

Les deux tiers restants du génome du VHC codent pour les protéines non structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

La protéine NS2 est une protéine hydrophobe de 23 kDa dont l'acide aminé N-terminal est en position 810 et l'acide aminé C-terminal en position 1026 sur la polyprotéine. La protéine NS2 et le tiers N-terminal de NS3 auraient une fonction de protéase assurant le clivage entre les protéines NS2 et NS3 (Grakoui et al., 1993). Cette protéase serait une métallo-protéase, zinc-dépendante. Cette observation est fondée sur le fait que l'activité de cette protéine serait inhibée par EDTA et stimulée par du  $ZnCl_2$ . L'histidine en position 952 et la cystéine en position 993 semblent impliquées dans l'activité catalytique de cette enzyme.

La protéine NS3 est une protéine de 70 kDa. Localisée entre les acides aminés 1027 et 1657 de la polyprotéine du VHC, elle possède deux domaines fonctionnels distincts : la partie N-terminale de la protéine code pour une protéase et le domaine C-terminal pour une NTPase/hélicase dépendante de l'ARN.

5 La protéine NS4A est une protéine d'un poids moléculaire apparent de 8 kDa. Elle est localisée sur la polyprotéine entre les acides aminés 1658 et 1711. Sa fonction serait de jouer un rôle de cofacteur pour la protéase NS3 car des études ont montré que le clivage des jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B et NS4B/NS5A nécessite la protéine NS4A. Cette protéine, sans être indispensable, accélère aussi le clivage NS5A/NS5B.

10 La protéine NS4B du VHC d'un poids moléculaire de 27 kDa n'a pas de fonction connue à ce jour. La protéine NS4B est localisée entre les acides aminés 1712 et 1972 de la polyprotéine du VHC. En outre la protéine NS4B apparaît comme une protéine basique.

15 La protéine NS5A du VHC d'un poids moléculaire de 56 kDa est une protéine qui interagit avec la protéine NS5B et participe vraisemblablement à la réplication du VHC. La protéine NS5A est localisée entre les acides aminés 1973 et 2420 de la polyprotéine du VHC du génotype 1a. Cependant, selon les différents génotypes observés, cette protéine peut comporter différentes insertions en acides aminés : elle comprend ainsi 466 acides aminés pour le génotype 2a, 452 acides aminés pour le génotype 3a alors  
20 qu'elle ne comporte que 466 acides aminés pour le génotype 1a. Si la fonction principale de cette protéine est encore inconnue, celle-ci présente néanmoins quelques caractéristiques. Ainsi l'expression d'une protéine de 56 kDa et d'une protéine 58 kDa a été observée. Elle correspond à une phosphorylation et à une hyperphosphorylation de la protéine NS5A conduisant respectivement à la production des protéines de 56 et 58  
25 kDa.

La protéine NS5B d'un poids moléculaire de 68 kDa est positionnée entre les acides aminés 2421 et 3011 de la polyprotéine. La présence de motifs peptidiques Gly-Asp-Asp ou motif GDD, analogues à ceux rencontrés dans la séquence polypeptidique des ARN polymérases ARN dépendantes de nombreux virus à ARN, permet de  
30 proposer la protéine NS5B comme candidate à la fonction de réplique.

Le virus de l'hépatite C semble exprimer son pouvoir pathogène exclusivement dans le foie des patients ou animaux infectés (Negro et al., 1992). Cependant des tentatives de propagation virale sur des hépatocytes humains ou provenant de

chimpanzé ont aboutit à des cycles abortifs (Lanford et al., 1994). D'autres travaux rapportés par Seipp et al. (1997), et concernant l'infection de différentes lignées cellulaires (HuH7 et HepG2) ou des cellules d'origine porcine (PK15) ont laissé apparaître la possibilité d'une infection virale et d'une réplication. Il est actuellement difficile d'envisager d'exploiter ces systèmes cellulaires en vue d'une production virale massive. La réplication du génome viral dans les lymphocytes du sang périphérique de patients atteints d'hépatite C, ou dans une sous population de monocytes/macrophages de PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) a été décrite par différents auteurs (Bouffard et al., 1992). Mais, plus récemment, Shimizu et ses collaborateurs (Shimizu et al., 1992 ; Shimizu et al., 1994) ont montré que la réplication du VHC pouvait s'effectuer soit dans une lignée provenant d'une leucémie lymphoblastique à cellules T (cellules Molt4) soit dans une lignée cellulaire HPB-Ma infectée au préalable par un rétrovirus murin (virus de leucémie murine). Un cycle infectieux a également été reproduit dans ces dernières cellules. La capacité de ces cellules à pouvoir répliquer le génome viral du VHC a permis la mise en place de test de neutralisation *in vitro* (Shimizu et al., 1994). C'est ainsi que la neutralisation du virus après incubation avec certains sérums de patients a été corrélée avec la perte du pouvoir de réplication du VHC sur ces lignées cellulaires. En outre, en utilisant la lignée cellulaire HPB-Ma, les auteurs ont pu également montrer la réinfection des cellules par le VHC et la sensibilité du virus à l'interféron (Shimizu et al., 1994).

Par ailleurs, il a été montré récemment par les groupes de C.M. Rice (Kolykhalov et al., 1997) et de R.H. Purcell (Yanagi et al., 1997) qu'il est possible de reconstituer un ADNc infectieux du VHC. En effet, des chimpanzés ayant reçu en injection intrahépatique de l'ARN transcrit à partir de l'ADNc complet du VHC, ont été capables de reproduire une infection après quelques semaines.

La demande de brevet européen EP 1 043 399 concerne un système pour la culture cellulaire du virus de l'hépatite C, qui comprend principalement des cellules eucaryotes contenant un matériel génétique spécifique du VHC transfecté, caractérisé par le fait que les cellules eucaryotes sont des cellules d'hépatomes humains et que le matériel génétique spécifique du VHC transfecté est une construction d'ARN du VHC, qui comprend les segments d'ARN spécifiques du VHC : 5'NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B et 3'NTR ainsi qu'un gène "marqueur" additionnel de sélection (gène de sélection). Les cellules concernées sont des cellules HuH7 d'hépatomes humains et le

génotype du virus de l'hépatite C utilisé est le génotype 1b (Lohmann et al., 1997). Cependant, ce procédé de réplication n'est pas applicable au génotype 1a du VHC.

Le problème majeur de l'étude du virus de l'hépatite C (VHC) est l'absence d'un système cellulaire susceptible de reproduire le cycle viral du VHC. En effet, il est difficile actuellement d'émettre quelconques hypothèses pour en expliquer les raisons. Cependant, la possibilité du virus de l'hépatite C de se répliquer sur certaines lignées cellulaires a parfois été mentionnée (Kato and Shimotohno, 2000). Il résulte que toutes les connaissances acquises sur le virus de l'hépatite C, notamment sur sa structure, l'assemblage de ses protéines et son organisation génomique, reposent sur des études de traduction d'ADN complémentaire du VHC effectuées *in vitro* en système acellulaire et *in vivo* dans les cellules en culture. Ainsi, les mécanismes de la propagation et de la réplication virale sont peu connus. Des blocages peuvent se produire à différents niveaux moléculaires. Ils peuvent avoir lieu au niveau de l'adsorption de la particule virale et de son récepteur, de la décapsidation de la particule virale, de l'expression du génome ou de la réplication.

Ainsi, l'un des aspects de l'invention est l'utilisation de cellules qui présentent des facteurs cellulaires particuliers, permettant la réplication du génome du virus de l'hépatite C dans ces cellules.

L'un des autres aspects de l'invention est l'utilisation de ces cellules pour la réplication ainsi que la multiplication et donc la production du virus de l'hépatite C.

L'un des autres aspects de l'invention est de fournir un nouveau procédé de réplication et de production du génotype 1a du virus de l'hépatite C, par transformation de cellules appropriées.

L'un des autres aspects de l'invention est de fournir un nouveau procédé de criblage d'agents anti-VHC et de fournir ainsi des inhibiteurs du virus de l'hépatite C.

L'invention concerne l'utilisation de cellules capables d'effectuer un processus de prénylation de protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C (VHC), telle que la prénylation de la protéine NS5A, pour la réplication et, le cas échéant, la production du VHC ou de mutants viables dérivés, dans un milieu de culture approprié.

De nombreuses protéines d'origine cellulaire, mais aussi virale, subissent des modifications post-traductionnelles qui orientent leur localisation cellulaire. Certaines de ces protéines portent ainsi des modifications d'acides gras. Une modification particulièrement intéressante est la prénylation qui correspond à l'alkylation d'une



cystéine par un groupement farnésyle (15 atomes de carbone) ou géranylgéranyle (20 atomes de carbone), ces groupements étant issus de la polymérisation de l'acide mévalonique.

5 La présence de deux résidus cystéines (CC) à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine NS5A (Grakoui et al., 1993) laisse à penser que cette protéine peut être modifiée par prénylation (Casey P. J., 1992). Les prényltransférases peuvent ajouter à la cystéine en position C-terminale un groupement farnésyle ou géranylgéranyle de 15 à 20 atomes de carbone, respectivement, et qui dérivent de la polymérisation de l'acide mévalonique. Les motifs identifiés et responsables de ces modifications sont souvent de type CAAX ou CC, où C est la cystéine, A est un acide aminé aliphatique et X est un  
10 acide aminé tel que M (Méthionine), S (Sérine), Q (Glutamine) ou L (Leucine).

L'expression "réplication du VHC" désigne le ou les processus moléculaires aboutissant à la synthèse d'un brin de polarité négative qui servira à engendrer de nouveaux brins de polarité positive constituant le matériel génomique du VHC.

15 L'expression "production du VHC" désigne la possibilité pour une cellule donnée de reproduire des particules infectieuses du virus de l'hépatite C (cycle de multiplication virale).

L'expression "mutants viables dérivés" désigne des variants viables ne pouvant provenir que de la sélection du réplicon du VHC sous différentes pressions de sélection.  
20 Cette pression de sélection doit engendrer la sélection de mutations dans le génome du VHC qui aboutissent à une meilleure répllication, à une expression plus quantitative des différentes protéines et par conséquent à une meilleure résistance des cellules vis-à-vis du produit de sélection. Seules les mutations viables permettant de résister à la pression de sélection sont observées. Les autres mutations, non viables, entraînent la mort de la  
25 cellule.

L'expression "dans un milieu de culture approprié" désigne le milieu dans lequel la lignée cellulaire est la plus apte à pousser. Le milieu de culture peut être notamment le milieu DMEM/10% SVF (sérum de veau fœtal) complémenté par les éléments nécessaires à la sélection, par exemple la néomycine (G418) ou l'hygromycine B.

30 Une utilisation avantageuse de l'invention est l'utilisation, telle que définie ci-dessus, de cellules de mammifères, notamment de cellules de reins de singes, encore désignées cellules Véro.

Les cellules Véro sont des cellules de reins normaux provenant de singes verts d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*, ATCC : CCL81)

L'invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, de cellules Véro transformées par un gène de résistance à un antibiotique, tel que la néomycine, notamment de cellules Véro/G418.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les cellules utilisées proviennent de la lignée cellulaire particulière Vn5, issue de la transformation d'une cellule Véro par le gène de résistance à un antibiotique, tel que la néomycine. Ces cellules Vn5 ou Véro/G418 sont décrites par Frese et al. (1995).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le gène de résistance à un antibiotique peut être choisi parmi les gènes de résistance à la bléomycine, la phléomycine, la zéocine ou la puromycine.

L'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de cellules, telles que les cellules Véro, le cas échéant transformées par un gène de résistance à un antibiotique, tel que la néomycine, lesdites cellules étant transformées par un acide nucléique contenant tout ou partie du génome du VHC ou des mutants dérivés du VHC.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les cellules Véro peuvent être transformées par les gènes de résistance aux antibiotiques suivants : les gènes de résistance à la bléomycine, la phléomycine ou la zéocine ; ou les gènes de résistance à la puromycine, l'hygromycine B ou la néomycine.

Afin de transformer les cellules, et notamment les cellules Véro/G418, l'acide ribonucléique utilisé comporte les parties suivantes du génome du VHC : les régions 5' et 3' non codantes, une partie des séquences codant pour la protéine de capsid C (séquence comprise entre 50 et 100 nucléotides) et la région codant pour les protéines non structurales, à savoir NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B ou NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

Les variants viables du VHC proviennent avantageusement de la sélection du réplicon sous différentes pressions de sélection. Cette pression provoque alors la sélection de mutations dans le génome qui aboutissent à une meilleure résistance contre le produit de sélection.

L'invention concerne également l'utilisation telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que l'acide nucléique est choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou

- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC.

5 Un acide nucléique codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC est par exemple la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 2.

Un acide nucléique codant pour les protéines non structurales du VHC est par exemple la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1.

10 Parmi les protéines structurales du VHC, on comprend les protéines telles que mentionnées ci-dessus, à savoir les protéines C, E1, E2 et p7.

Parmi les protéines non structurales du VHC, on comprend les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

15 L'expression "réplicon contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC" désigne un acide nucléique contenant les régions 5' et 3' non codantes du génome du VHC, une partie de la séquence codant pour la protéine de capsid C du VHC suivie des séquences nucléotidiques codant pour l'Hygromycin-B-phosphotransférase (HPH) et des séquences nucléotidiques codant pour les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, définies ci-dessus (voir Figure 1).

20 La possibilité de remplacer toute ou partie des protéines de structure ayant été réalisée pour d'autres virus à ARN positifs et disposant actuellement d'un cADN complet du VHC, un réplicon du VHC a été construit en gardant une partie des séquences codantes pour la protéine de capsid C. En effet, il a été montré par l'équipe du Dr Jackson (Reynolds et al., 1995) que ces séquences jouaient un rôle important dans  
25 l'initiation de la traduction du VHC via l'IRES (site interne d'entrée des ribosomes). Afin de maintenir l'intégrité de cet IRES et dans les conditions du VHC, une partie des séquences codant pour la protéine de capsid a été conservée. La séquence des protéines de structure a été ainsi substituée par la séquence codant pour le gène de résistance à l'hygromycine B. Par cette approche, il est possible de maintenir les cellules sous  
30 pression de sélection par l'hygromycine B afin de sélectionner des clones cellulaires résistants. Ces résultats ne peuvent s'expliquer que par la maintenance du réplicon à l'intérieur de la cellule. Cependant d'autres marqueurs de sélection peuvent être utilisés pour faciliter cette sélection, comme la puromycine, la zéocine ou la bléomycine.

L'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que les cellules sont transformées par un acide nucléique choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3.

5 La séquence SEQ ID NO : 1 correspond à la partie de la séquence du VHC de génotype 1a codant pour les protéines non structurales, à savoir les protéines NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à la séquence entière du VHC de génotype 1a (protéines structurales et non structurales).

10 La séquence SEQ ID NO : 3 correspond au réplicon obtenu par fusion d'un gène de résistance à l'hygromycine B avec la partie de la séquence du VHC de génotype 1a codant pour les protéines non structurales.

L'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, pour la réplication, et le cas échéant, la production du VHC de type 1a.

15 Le génotype de type 1a du VHC est notamment décrit par Peter Simmonds (2001).

La caractéristique principale des génotypes du VHC est leur variabilité. En effet, les génomes diffèrent entre eux par leurs nucléotides avec un pourcentage variant de 31 à 34%, ce qui entraîne également une variabilité en acides aminés.

20 L'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de cellules telles que déposées à la CNCM le 13 avril 2001 sous les numéros I-2658 et I-2659.

La souche, enregistrée sous le numéro I-2659, correspond aux cellules Véro/G418 (Vn5), telles que définies ci-dessus.

25 La souche, enregistrée sous le numéro I-2658, correspond à des cellules Véro/G418 + réplicon, qui sont des cellules Véro/G418 dans lesquelles a été insérée la séquence SEQ ID NO : 3, telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par SEQ ID NO : 1.

L'invention concerne une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par SEQ ID NO : 3.

30 L'invention concerne un vecteur recombinant, notamment plasmide, cosmide, phage ou ADN de virus, contenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

Un vecteur avantageux de l'invention est un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, contenant les éléments nécessaires à l'expression dans une cellule hôte des polypeptides codés par les acides nucléiques tels que définis ci-dessus, insérés dans ledit vecteur.

5            Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant défini ci-dessus contient notamment un promoteur reconnu par l'ARN polymérase de la cellule hôte, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence de transcription, de terminaison, et éventuellement une séquence signal et/ou d'ancrage.

10           Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant, tel que défini ci-dessus, contient les éléments qui permettent l'expression d'une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, en tant que protéine mature ou protéine de fusion.

15           Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur utilisé pour le clonage du VHC est le vecteur pGEM 3Zf (+) (Proméga). Ce vecteur contient le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du plasmide et le fragment intergénique du phage f1. De plus, les fragments du VHC sont placés sous contrôle du promoteur T7 ou SP6.

20           L'invention concerne également une cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

            Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la cellule hôte telle que définie ci-dessus, contient les éléments de régulation permettant l'expression de l'une des séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus.

25           Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise les bactéries DH5  $\alpha$ , commercialisées par la société Gifco. Ces bactéries sont utilisées pour amplifier, après transfection, les plasmides pGEM3Zf (Proméga) qui possèdent les séquences complémentaires du VHC ou les séquences du réplicon. Tous les plasmides contenant des séquences du VHC sont utilisés pour la transformation des bactéries  
30           DH5 $\alpha$ . Les séquences du VHC sont stables dans cette bactérie.

            Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les cellules utilisées pour la production virale des virus vaccines recombinants sont notamment les cellules Tk- (voir partie expérimentale, I-3) ou les cellules CV1L.

Les virus vaccines recombinants sont produits à partir des plasmides pTM1 (Moss et al., 1990) et recombines selon la procédure expérimentale. Ces virus recombinants contiennent les séquences codant pour la protéine NS5A ou des formes tronquées en partie N-terminale de la protéine NS5A.

5 La souche de cellules CV1 est une lignée continue dérivant de cellules de reins de singes verts d'Afrique (AGMK) et la souche CV1-L est issue d'un sous-clonage de la souche de CV1.

L'invention concerne toute cellule transformée constituée par une cellule Véro/G418, comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- 10
- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
  - ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
  - les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC.

15 Une cellule avantageuse selon l'invention est une cellule telle que définie ci-dessus, constituée par une cellule Véro/G418 comprenant un réplicon constitué par un acide nucléique choisi parmi ceux contenant un gène de résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC, à savoir NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

20 Une cellule avantageuse de l'invention est une cellule telle que définie ci-dessus, telle que la cellule Véro/G418 déposée à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2659.

25 Une cellule avantageuse selon l'invention est une cellule telle que définie ci-dessus, telle que la cellule Véro/G418, comprenant un acide nucléique contenant un gène de résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC, et déposée à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2658.

30 Une cellule avantageuse selon l'invention est une cellule telle que définie ci-dessus, constituée par une cellule Véro/G418 comprenant un acide nucléique contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales, et ayant la propriété de répliquer le VHC à une concentration d'antibiotique, notamment d'hygromycine B, de 800 à 1000 µg/ml.

L'invention concerne également un procédé de production du virus de l'hépatite C, qui comprend l'infection de cellules Véro/G418, notamment de cellules Véro/G418 telles que déposées à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2659, par le virus de l'hépatite C et la mise en culture dans des conditions appropriées de ces cellules infectées.

Les cellules Véro/G418 + réplicon sont testées dans un premier temps par infection à partir d'un stock viral VHC titré afin de déterminer si cette lignée cellulaire peut être infectée et susceptible de produire du virus.

Ensuite, il est nécessaire de cloner les séquences des réplicons les plus fonctionnels pour les replacer dans l'ADNc complet du VHC, puis de transfecter les cellules Véro/G418 + réplicon ou Véro/G418 pour déterminer s'il y a infectivité et production virale.

Le réplicon le plus fonctionnel est avantageusement obtenu à partir de la cellule qui résiste à la plus forte concentration en hygromycine B. La croissance de la cellule indique une expression plus importante du gène de résistance à l'hygromycine B qui est reliée à l'efficacité de réplication du réplicon.

L'infectivité déterminée ici est l'infectivité de l'ADN complémentaire du VHC, c'est-à-dire la possibilité de reconstituer des particules virales infectieuses après transfection de cellules par de l'ARN issu de la transcription de l'ADNc du VHC. Le virus est alors capable de se propager sur une culture cellulaire appropriée et de produire des particules virales en quantité.

L'invention concerne également un procédé de réplication du virus de l'hépatite C par transformation de cellules Véro/G418 avec un acide nucléique tel que défini ci-dessus, et notamment par transformation des cellules Véro/G418 telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2659, pour obtenir des cellules Véro/G418 transformées, notamment celles déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2658, et par mise en culture de ces cellules transformées dans des conditions appropriées.

La réplication du VHC ne peut avoir lieu que dans certaines cellules qu'il est utile de sélectionner. Pour cela, on utilise un réplicon, unité minimale de réplication, qui contient les séquences du gène de résistance à l'hygromycine B, insérées à la place des séquences codant pour les protéines de structure du VHC. La possibilité que certaines cellules ont de pousser en milieu sélectif (par exemple DMEM/10% SVF et

hygromycine B) est une indication de la réplication du génome du VHC car le gène de résistance à l'hygromycine B est apporté par le VHC. En sélectionnant des cellules résistantes, on sélectionne également des génomes du VHC capables de se répliquer dans ces cellules. Par conséquent, la réplication du VHC est liée à la sélection des cellules résistantes.

Ce procédé repose donc sur une méthode de sélection de cellules susceptibles de répliquer le génome du VHC.

L'invention concerne également un procédé de production du virus de l'hépatite C par transformation de cellules Véro/G418, notamment de cellules Véro/G418 telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2659, avec un acide nucléique codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC, par la mise en culture dans des conditions appropriées des cellules Véro/G418 transformées et la récupération des particules de virus VHC.

Dans un premier temps, des cellules poussant sous des pressions de 1,5 à 2,0 mg/ml d'hygromycine B sont sélectionnées, puis l'ARN total de ces cellules est extrait pour convertir l'ARN du VHC en ADN. Celui-ci est ensuite cloné dans un vecteur pGEM 3Zf (Proméga) dans lequel seule la séquence codant pour les protéines non structurales du réplicon est réintroduite en lieu et place de l'ADNc complet du VHC. Ainsi, on introduit toutes les variations nécessaires à une meilleure réplication du VHC sur les cellules utilisées. L'ADN obtenu est ensuite converti en ARN et cet ARN sert à la transfection des cellules Véro/G418 afin de déterminer si une production virale est possible sur ces cellules.

L'invention concerne également un procédé de criblage d'agents anti-VHC, qui comprend les étapes suivantes :

– la mise en présence du composé testé pour ses propriétés anti-VHC avec des cellules transformées, constituées par des cellules Véro/G418, comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC,



et notamment avec des cellules telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2658,

- l'extraction des ARN totaux sur lesdites cellules, et
- l'analyse de l'éventuelle diminution du taux de synthèse de l'ARN du VHC

desdites cellules par rapport à une valeur de contrôle correspondant aux taux de synthèse des ARN du VHC des cellules en l'absence dudit composé testé.

Les cellules Véro/G418 + réplicon poussant à des concentrations en hygromycine B comprises de 800 à 2000 µg/ml sont soumises à l'action d'inhibiteurs spécifiques de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase, tels que la mévastatine ou la lovastatine. Puis, des extractions d'ARN sont effectuées à des instants variables sur des cellules traitées par ces inhibiteurs. La synthèse des ARN du VHC est ensuite analysée par RT-PCR en une seule étape à l'aide d'un appareil appelé LightCycler (Roche) ou par hybridation sur filtres des ARN à l'aide de sondes radioactives spécifiques du VHC.

On peut également utiliser le système suivant qui consiste à reproduire un réplicon contenant également les séquences codant pour la protéine GFP dont la propriété est de fluorescer de façon naturelle sous une certaine longueur d'onde. De plus, on choisit cette protéine avec un temps de demi-vie relativement court. Dans ces conditions, il n'est pas nécessaire de fixer les cellules et la fluorescence peut être observée en temps réel. Si un inhibiteur efficace du VHC est mis en contact avec les cellules Véro/G418 + réplicon et qu'on observe une inhibition de la synthèse de l'ARN du VHC, cela s'observe également au niveau de la synthèse des protéines produites, et par conséquent sur l'intensité de fluorescence produite par la GFP. La durée de demi-vie de la GFP étant alors très courte, on observe une diminution de la fluorescence de la GFP dans les cellules.

L'invention concerne l'utilisation d'hypocholestérolémiants, notamment des statines, et plus particulièrement de la lovastatine, de la mévastatine, de la simvastatine, de la pravastatine et de la fluvastatine, pour la fabrication de médicaments pour le traitement de l'hépatite C.

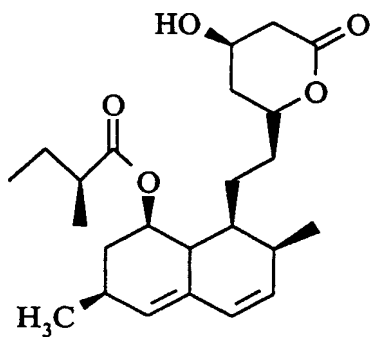
Les statines sont des produits utilisés pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Ils agissent au niveau de l'enzyme hydroxyméthylglutaryl (HMG) CoA synthétase afin de bloquer la synthèse de l'acide mévalonique. L'acide mévalonique, qui intervient dans la voie de biosynthèse du cholestérol, produit également par polymérisation le géranyle ou le farnésyle.

Ainsi, les statines, en bloquant la synthèse de l'acide mévalonique, affectent également la synthèse des groupements farnésyle ou géranyle ; ils ont donc un effet indirect sur la prénylation.

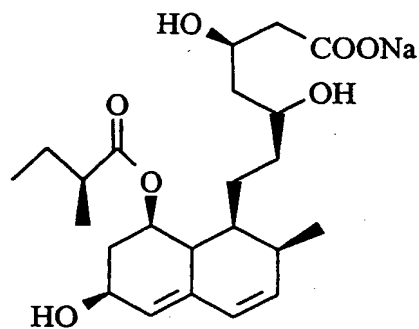
Ces statines peuvent donc être utilisées afin de vérifier le procédé de criblage anti-VHC tel que défini ci-dessus.

**Formules chimiques de quelques statines :**

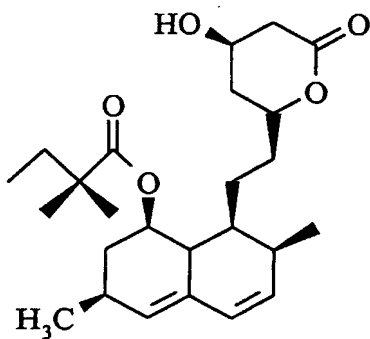
**Lovastatine**



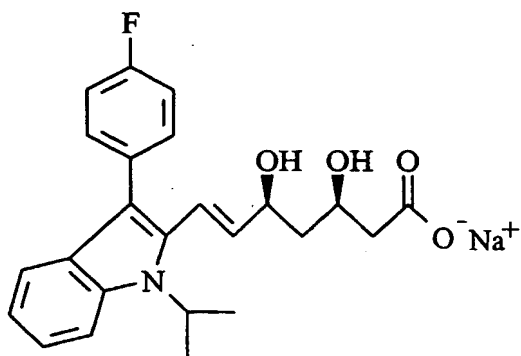
**Pravastatine**



**Simvastatine**



**Fluvastatine**



L'invention concerne également l'utilisation d'inhibiteurs de prénylation, pour la fabrication de médicaments pour le traitement de l'hépatite C, le cas échéant en association avec un antiviral.

L'invention concerne un procédé de préparation de cellules Véro/G418  
5 comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à l'hygromycine B et une  
séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC,

10 ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- \* l'insertion d'une des séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus dans les cellules Véro/G418,

- \* la soumission des cellules ainsi obtenues à des concentrations d'hygromycine B croissantes, notamment de 800 à 1000 µg/ml.

15 L'invention concerne des cellules telles qu'obtenues par mise en œuvre du procédé tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme substance active, un composé inhibiteur de prénylation, en association avec un agent antiviral et un excipient pharmacologiquement acceptable.

20 La prénylation est importante pour la protéine NS5A car elle favorise des interactions protéine-protéine ; toutes les perturbations de ces interactions agissent sur le processus de réplication du VHC et diminuent son efficacité.

L'association d'un inhibiteur de prénylation qui diminue le taux de réplication du VHC entraîne également une diminution de la charge virale<sup>1</sup> du VHC chez un patient infecté. De ce fait, l'action combinée avec un agent antiviral doit conduire à une  
25 meilleure élimination du virus chez les patients infectés.

L'invention concerne une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme substance active, un composé hypocholestérolémiant, en association avec un agent antiviral et un excipient pharmacologiquement acceptable.

30 Un composé agissant sur la synthèse de l'acide mévalonique a une action sur le taux de prénylation de la protéine NS5A du VHC et par conséquent sur la réplication du VHC. L'association d'un composé hypocholestérolémiant, qui agit indirectement sur la réplication du VHC, entraîne également une diminution de la charge virale du VHC

chez un patient infecté. De ce fait, l'action combinée avec un agent antiviral doit conduire à une meilleure élimination du virus chez les patients infectés.

Le composé hypercholestérolémiant utilisé est choisi parmi la lovastatine, la mévastatine, la simvastatine, la pravastatine et la fluvastatine.

5 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont notamment sous la forme de comprimés de 20 mg, la prise quotidienne étant comprise entre 10 et 40 mg.

### **DESCRIPTION DES FIGURES**

10 La Figure 1 est un schéma du réplicon du génotype 1a du virus de l'hépatite C. Ledit réplicon contient : les séquences 5' et 3' correspondant aux régions non codantes du VHC ; la séquence nucléotidique codant pour une partie de la protéine de capsid (C'), c'est-à-dire les 246 nucléotides (acides aminés 1 à 82) ; la séquence nucléotidique codant pour le gène Hygromycine B phosphotransférase qui est le gène de sélection (noté Hygromycine<sup>R</sup> sur le schéma) ; les séquences nucléotidiques codant pour les protéines non structurales correspondant à : NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B et noté NS2 → NS5B. Le site Asp 718 est l'un des sites de restriction compris dans la séquence nucléotidique de la protéine de capsid qui a servi à l'insertion des séquences codant pour le gène de sélection. Le site de restriction XbaI est le site qui est utilisé pour linéariser l'ADN avant transcription. Ce site est ensuite modifié selon la méthode décrite dans la partie "Matériels et Méthodes".

25 Les Figures 2A à 2D représentent des résultats d'immunofluorescence sur les cellules Véro/G418 + réplicon. Les cellules Véro/G418 sont cultivées sur lamelles de verre en absence d'hygromycine B (Figure 2D) et les cellules Véro/G418 + réplicon en présence d'hygromycine B (800 µg/ml) (Figures 2A, 2B et 2C). Ces cellules sont ensuite traitées selon les méthodes décrites dans la partie "Matériels et Méthodes".

30 La Figure 2A correspond à l'immunofluorescence indirecte obtenue sur des cellules Véro/G418 + réplicon à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine de capsid C.

La Figure 2B correspond à l'immunofluorescence indirecte obtenue sur des cellules Véro/G418 + réplicon à l'aide d'un sérum de patient infecté par le VHC.

La Figure 2C correspond à l'immunofluorescence indirecte obtenue sur des cellules Véro/G418 + réplicon à l'aide d'un anticorps polyclonal produit chez le lapin et dirigé contre la protéine NS4.

La Figure 2D correspond à l'immunofluorescence indirecte obtenue sur des cellules Véro/G418 (cellules témoins) à l'aide d'un anticorps polyclonal produit chez le lapin et dirigé contre la protéine NS4.

Les Figures 3A, 3B, 3C et 3D concernent la caractérisation de la prénylation de la protéine NS5A du virus de l'hépatite C.

La Figure 3A représente le résultat des immunoprécipitations, obtenues à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine NS5A, et effectuées sur des extraits cellulaires provenant de cellules Vero/G418 (ou Vn5), infectées soit seulement par le virus vaccine recombinant vTF7-3 (ligne 1), soit par les virus recombinants vaccines vTF7-3 et vvNS5A (ligne 2), et marquées soit en présence d'acide mévalonique  $H^3$ , soit en présence de méthionine  $S^{35}$ . La protéine NS5A immunoprécipitée est indiquée par une flèche.

La Figure 3B représente le résultat des immunoprécipitations obtenues à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine NS5A et effectuées sur des extraits cellulaires provenant de cellules Vn5 (Vero/G418) infectées par les virus vaccines recombinants vTF7-3 seul (ligne 1), vTF7-3 et vvNS5A.1a (ligne 2) et vTF7-3 et vvNS2-5B (ligne 3). La présence de la protéine NS5A est indiquée par une flèche.

La Figure 3C représente le résultat des immunoprécipitations obtenues à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine NS5A et effectuées sur des extraits cellulaires provenant de cellules Vn5 (Vero/G418) infectées par les virus vaccines recombinants vTF7-3 seul (ligne 1), vTF7-3 et vvNS5A.1a dl1 (délétion des acides aminés situés entre les positions 1973 et 2100, ligne 2), vTF7-3 et vvNS5A.1a dl2 (délétion des acides aminés situés entre les positions 1973 et 2073, ligne 3), vTF7-3 et vvNS5A.1a dl3 (délétion des acides aminés situés entre les positions 1973 et 2001, ligne 4), et vTF7-3 et vvNS5A.1a (ligne 5), et marqués soit en présence d'acide mévalonique  $H^3$ , soit en présence de méthionine  $S^{35}$ . La position des différentes protéines NS5A.1a tronquées est indiquée par un trait sur le côté de la figure.

La Figure 3D représente le résultat des immunoprécipitations obtenues à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine NS5A et effectuées sur des

extraits cellulaires provenant de cellules Vn5 (Vero/G418) infectées par les virus vaccines recombinants vTF7-3 et vvNS5A de génotype 1a, vTF7-3 et vvNS5A de génotype 1b provenant de deux patients différents (lignes 1 et 2), et marqués en présence d'acide mévalonique H<sup>3</sup>. La position de la protéine NS5A est indiquée par une  
5 flèche.

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### **I - LA PRÉNYLATION : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### **1. Cellules et conditions d'entretien.**

**Cellules Véro/G418 :** Les cellules Véro/G418 (ou Vn5) (Frese et al., 1995) sont cultivées en couche mince dans des boîtes de 10 mm et dans un milieu DMEM (Milieu de Eagle modifié par Dulbecco) et contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les  
15 cellules peuvent être cultivées sous pression de Néomycine à 300 µg/ml (valeur d'entretien pour ces cellules). Elles sont décollées tous les 5 ou 6 jours par une solution de trypsine/versène (NaCl 8g/l ; KCl 0,4 g/l ; dextrose 1g/l ; NaHCO<sub>3</sub> 0,58g/l ; Trypsine cristallisée 0,045g/l ; Versène 0,2 g/l) et 1-10<sup>6</sup> cellules sont transférées dans une boîte de 100 mm, ce qui correspond à une dilution 1/10. Le milieu est changé tous les deux à  
20 trois jours.

#### **2. Clonage du génome du virus de l'hépatite C.**

En utilisant des amorces spécifiques de la séquence du virus de l'hépatite C, on a synthétisé un ADNc selon la méthode de Gübler et Hoffman (Gübler and Hoffman,  
25 1983). Puis, grâce à des amorces de séquences connues, le génome de l'hépatite C a pu ensuite être amplifié par la méthode dite "nested primers" (Mullis and Faloona, 1987). Des fragments d'ADN correspondant à différentes régions du génome du VHC ainsi que les séquences correspondant aux extrémités non codantes du génome du virus VHC ont été clonés dans un vecteur pGEM 3Zf(+) (Proméga) au site de restriction unique Sma1.  
30 Ce vecteur contient le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication du plasmide et le fragment intergénique du phage fl. En outre, les fragments sont placés sous contrôle du promoteur T7 à l'extrémité 5' du VHC ou SP6 à l'extrémité 3' du VHC. Tous ces clones ont été construits avec des séquences chevauchantes d'ADN afin

de faciliter les recombinaisons *in vitro*. Après des digestions totales ou partielles de l'ADN de ces différents clones, des fragments ont été purifiés sur gel d'agarose et ligués entre eux de façon à reconstituer le génome du virus de l'hépatite C. C'est ainsi qu'un ADNc long de 9623 nucléotides a pu être généré.

### 3. Construction des plasmides pTM1 recombinants et production des virus recombinants de la vaccine correspondante.

Différents fragments d'ADN codant pour les protéines du VHC et notamment de la protéine NS5A du VHC ont été générés par amplification enzymatique à partir du génome du VHC (pG/ HCV 1-9623). Ces ADN ont été insérés au niveau du site de restriction EcoRI dans la région de clonage multiple du plasmide pTM1 (Moss et al., 1990). Cette région se situe immédiatement en aval du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 et de l'IRES (site interne d'entrée des ribosomes) du virus EMCV (*Encephalomyocarditis virus*).

Les virus recombinants de la vaccine correspondants ont été générés par recombinaison homologue selon le principe défini par Kieny et al. (1984). Les virus recombinants sont purifiés par formation de plages sur cellules 143 B tk- (cellules déficientes en thymidine kinase, ATCC CRL-8303) en présence de bromodeoxyuridine (50 µg/ml). Chaque stock viral dérivant d'une plage isolée a été amplifié sur cellules CV1-L (souche issue du sous-clonage de cellules de reins de singe vert d'Afrique) après infection à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 1 unité formant plaque par cellule (UFP/cellule) (Fourmillier et al., 1996).

### 4. Analyse des protéines exprimées à l'aide des virus recombinants vaccine-VHC.

**Marquage (<sup>35</sup>S) des protéines :** Des cellules Véro/G418 (Vn5) ont été infectées soit avec le virus vTF7.3 (Fuerst et al., 1986) seul, soit co-infectées par ce virus et un des virus recombinants exprimant la protéine NS5A du VHC, chacun à une m.o.i. de 5 UFP/cellule. Après une heure à 37°C, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu DMEM contenant 5% de sérum de vœu fœtal. A 16h post-infection, les cellules sont lavées par du milieu DMEM sans méthionine, puis incubées dans ce milieu pendant 1 à 2 heures, puis marquées 3 heures avec 100 µCi/ml de méthionine (<sup>35</sup>S) (<sup>35</sup>S-Protein Labeling Mix (NEN), solution de marquage). Après ce temps, le milieu est éliminé et

les cellules sont ensuite lavées par du PBS, et finalement sont lysées à l'aide d'un tampon de lyse pour extraction cytoplasmique (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; NP40 (ou Igepal) 1% (Sigma) ; Na déoxycholate 0,1% ; Aprotinine 10 µg/ml ; TPCK (Sigma) et PMSF (Sigma), 20 µg/ml) ou pour extraction totale par une solution de lyse contenant : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 0,5% Na déoxycholate ; 0,2% SDS ; Aprotinine 10 µg/ml ; TPCK et PMSF, 20 µg/ml. Les protéines du VHC sont ensuite immunoprécipitées à partir de ce lysat à l'aide de sérums polyclonaux de lapin comme décrit par Wychowski et al. (1985) et les précipités ont été analysés par SDS-PAGE.

**Marquage à l'acide mévalonique ( $^3\text{H}$ ) des protéines :** Des cellules Véro/G418 (Vn5) ont été infectées soit avec le virus vTF7.3 (Fuerst et al., 1986) seul, soit co-infectées par ce virus et un des virus recombinants exprimant la protéine NS5A du VHC, chacun à une m.o.i. de 5 UFP/cellule. Après une heure à 37°C, l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu DMEM contenant 10% de sérum de vœu fœtal en présence de Mévastatine (100 µg/ml). Après 4 heures, 100 mCi/ml d'acide mévalonique ( $^3\text{H}$ ) sont ajoutés au milieu. Après 18h post-infection, les cellules sont lavées par du milieu DMEM, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées par une solution PBS avant d'être lysées par un tampon contenant : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 0,5% Na déoxycholate ; 0,2% SDS ; Aprotinine 10 µg/ml ; TPCK et PMSF, 20 µg/ml. Les protéines du VHC sont ensuite immunoprécipitées à partir de ce lysat à l'aide de sérums polyclonaux de lapin comme décrit précédemment et les précipités sont analysés par SDS-PAGE.

## **II - ANALYSES DU RÉPLICON DU VHC : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **1. Construction du réplicon du VHC à partir de l'ADN complémentaire du VHC.**

A partir du clone contenant la totalité de la séquence du VHC (pG/ HCV 1-9623), un réplicon du VHC a été initialement construit dans lequel les séquences codant pour les protéines structurales ont été substituées par les séquences codant pour la Néomycine. L'ADN correspondant au gène de la néomycine a été introduit entre les sites de restriction Asp718 (position 579 de la séquence nucléotidique du VHC de génotype 1a) et le site de restriction Eco47III (position 2847 de la séquence



nucléotidique du VHC de génotype 1a). Un fragment d'ADN correspondant à la séquence codant pour la Néomycine a été amplifié à l'aide d'amorces complémentaires de la séquence codant pour la Néomycine et contenant en 5' et 3' les sites de restriction Asp718 et Eco47III. Le fragment amplifié a été purifié sur gel low melting (gel d'agarose à faible point de fusion), puis ce fragment a été digéré par les enzymes de restriction ci-dessus mentionnées. Ce fragment a ensuite été intégré dans le plasmide pG/HCV 1-9623, délété de sa séquence entre Asp718 et Eco47III. Les séquences ont été ainsi insérées de façon à être en phase avec une partie restante des séquences codant pour la protéine de capsid et avec les séquences codant pour la protéine NS2. Cependant, à cause de la position du site de restriction Eco47III, la partie NH2 terminale de NS2 a été déléetée. Par conséquent, l'intégralité des séquences NS2 a été reconstituée en amplifiant par PCR la totalité des séquences codant pour NS2 et une partie de la séquence codant pour la protéine NS3. L'amorce en position 5' de la séquence contient également les séquences du site de restriction SpeI. Le fragment d'ADN a été amplifié et purifié selon les procédures habituelles, puis il a été digéré par les enzymes SpeI et l'enzyme Bst1107I dont la position de ce site est en position 3640 de la séquence nucléotidique du VHC de génotype 1a. Finalement, ce fragment a été intégré entre les sites de restriction SpeI et Bst1107 I. Le plasmide résultant pG/Néo 2-5B a été obtenu. Ce plasmide contient les régions non codantes 5' et 3', une partie de la séquence codant pour la protéine de Capsid C, les séquences du gène de résistance à la néomycine et la totalité des séquences codant pour la région des protéines non structurales du VHC. Il apparaît dans cette construction que la partie de capsid est fusionnée au gène de résistance à la néomycine et au produit NS2 du VHC. Les autres protéines du VHC seront normalement produites par des clivages qui seront générés par les deux protéases virales du VHC. Les cellules Véro/G418 étant résistantes à la néomycine, le plasmide pG/Néo 2-5B a été utilisé pour substituer les séquences codant pour la néomycine par les séquences codant pour le gène de résistance à l'hygromycine B. Un fragment d'ADN contenant les séquences de résistance à l'hygromycine B ainsi que les séquences des sites de restriction Asp718 et XbaI localisés respectivement aux extrémités 5' et 3' a été amplifié. Le site XbaI est compatible avec le site SpeI, mais après hybridation les sites SpeI et XbaI ne seront pas générés. Le site unique SpeI disparaît de la séquence. Ce fragment d'ADN a ainsi été intégré entre les sites Asp718 et SpeI du plasmide pG/Néo 2-5B. Après transformation et sélection, un plasmide

pG/Hygro 2-5B a été obtenu dans lequel les séquences codant pour le gène de résistance à la néomycine ont été remplacées par celles codant pour le gène de résistance à l'hygromycine B et les autres séquences étant en tout point conservées.

## 2. Transcription de l'ADN complémentaire du VHC en ARN

**Transcription pour transfection :** Pour de grande production d'ARN le kit de chez Proméga (Ribo MAX <sup>TM</sup> Large Scale RNA production system-T7) a été utilisé. L'ADN correspondant au réplicon a été au préalable linéarisé et rendu bouts francs. A l'extrémité 3' du génome du VHC, un site de restriction a été placé afin qu'après digestion par l'enzyme de restriction XbaI et traitement à la Mung bean nuclease (Biolabs)(Kowalski et al., 1976), les bases excédentaires soient digérées, ce qui correspond dès lors à l'extrémité authentique de l'ARN du VHC. Le traitement est réalisé sur 5 µg d'ADN. Après extraction par le phénol et le chloroforme de la préparation d'ADN, l'ADN est récupéré par précipitation à l'éthanol. Une fois centrifugé l'ADN est repris par de l'eau stérile qui a été traitée au DEPC (Diéthylpyrocarbonate), afin d'éviter toute trace de Rnase. L'ADN peut alors être transcrit en ARN. Ainsi, dans un tube eppendorf stérile, 20 µl d'ADN (environ 5 µg) sont complétés par : 20 µl d'eau traitée au DEPC, 20 µl de tampon de transcription 5X (Hepes-KOH (pH 7,5) 400 nM, MgCl<sub>2</sub> 120 mM, spermidine 10 mM, DTT 200 mM), 30 µl de rNTPs (25mM ATP, CTP, GTP, UTP), 10 µl Enzyme Mix (T7) (Proméga) et le mélange est incubé à 37°C pendant 2 à 4 heures. Une fois l'ADN transcrit par l'ARN polymérase T7, la matrice d'ADN est dégradée par 5 µl de RQ1 Dnase (Rnase free) (Proméga) pendant 15 à 30 minutes à 37°C. Une extraction phénol/chloroforme est réalisée et la solution aqueuse contenant l'ARN est précipitée en ajoutant 1/10 d'acétate de sodium 3M et deux volumes d'éthanol. Après une nuit, on centrifuge pour récupérer le culot d'ARN. Celui-ci est ensuite lavé par une solution d'éthanol à 70%, puis séché légèrement sur la paillasse puis finalement resolubilisé par de l'eau stérile traitée au DEPC. L'ARN par la suite sera conservé à -80°C.

**Transcription pour marquage radioactif :** On utilise un kit de transcription Proméga. L'ADN servant de matrice pour la production d'ARN radioactif provient d'ADN amplifié par la méthode PCR et dans lequel les amorces en position 5' ou 3' contiennent les séquences des promoteurs pour les bactériophages T7 ou SP6 ce qui permet ainsi de produire des ARN de polarité négative ou positive suivant que l'on

recherchera à caractériser respectivement des ARN de polarité positive ou négative des réplicons. Pour les ADN produits par PCR, il n'est pas nécessaire de linéariser par une enzyme de restriction puisque les extrémités sont bouts francs. Cependant, les fragments d'ADN seront purifiés sur gel low melting (gel d'agarose à faible point de fusion) avant d'être transcrit. 3 µl d'ADN (correspondant à 1-2 µg) sont complétés par 4 µl de tampon de transcription 5X (Tris-HCl (pH 7,9 à 25°C) 200 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, spermidine 10 mM), 2 µl d'une solution de DTT 100 mM, 0,5 µl de RNasin (inhibiteur) (40 U/µl) (Blackburn and Moore, 1982), 4 µl d'un mélange de rNTPs (rATP, rUTP et rGTP, 2,5 mM chacun) dans lequel le rCTP a été omis, 5,5 µl d'eau traitée au DEPC, 1 µl d'enzyme polymérase T7 (20 U/µl) et 50 µCi de dCTP αP<sup>32</sup> lyophilisé. L'ADN est transcrit pendant 1 heure à 37°C. Puis l'ADN est dégradé comme décrit précédemment et l'ARN est précipité puis resolubilisé dans de l'eau traitée au DEPC.

### 3. Technique d'électroporation

Cette technique a été réalisée selon une procédure décrite par Liljeström et al. (1991). L'appareil ayant servi aux électroporations est de la marque BioRad (BioRad Gene Pulsar with Pulse controller). Les cellules Véro/G418 ont été ensemencées sur des boîtes de 100 mm et dans un milieu DMEM complété de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et elles ont été laissées en culture jusqu'à ce qu'une confluence de 80 à 90% soit atteinte. Il est à noter que 5.10<sup>6</sup> cellules sont nécessaires pour chaque électroporation. En conséquence, le nombre de boîtes est calculé pour disposer d'une quantité de cellules suffisantes. Les cellules à électroporer sont lavées par une solution de PBS puis sont décrochées à l'aide d'une solution de trypsine contenant de l'EDTA. Cette solution est éliminée, et après quelques minutes les cellules qui se décrochent sont reprises dans du milieu DMEM 10% de SVF et centrifugées à 800 tpm pendant 6 minutes. Les cellules sont alors reprises et relavées par une solution de PBS puis le culot de cellules, après centrifugation, est repris par un volume de milieu PBS de façon à ce que la concentration finale en cellules soit de 1.10<sup>7</sup> cellules/ml. Celles-ci sont conservées dans la glace. Dans une cuve à électroporation de 0,2 mm de la marque BioRad, 500 µl de la suspension cellulaire à 1.10<sup>7</sup> cellules/ml sont mis en contact avec 30 µg d'ARN (ARN du réplicon) et le même tube est placé dans l'appareil à électroporation qui a été étalonné à 1,75 kV et 25 µFD, tandis que le contrôleur de la résistance était sur la position infini (bouton ∞ de l'appareil). Les cellules ont ainsi reçu

deux chocs électriques. Le pourcentage de cellules qui survivent à ces chocs est de 20 à 30%. Après ces chocs, les cellules sont reprises dans du milieu DMEM 10% SVF et elles sont gardées à température de la pièce pendant 10 minutes avant d'être réensemencées sur une boîte de 100 mm. Puis toutes les boîtes sont placées dans une étuve à CO<sub>2</sub> et à une température de 37°C. Elles sont ensuite prêtes pour subir la pression de sélection par l'hygromycine B.

#### 4. Sélection des cellules résistantes à l'hygromycine B.

Les cellules Véro/G418 électroporées en présence de l'ARN du VHC et contenant le gène de résistance à l'hygromycine B ont été utilisées pour une pression progressive en présence d'hygromycine B. Une fois électroporées, comme décrit précédemment, les cellules sont initialement déposées sur des boîtes de 100 mm. Après 48 heures, les cellules sont soumises à une faible pression de 100 µg/ml en hygromycine B puis à 200 µg/ml jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence. Elles sont ensuite décollées par action du mélange trypsine/versène et elles sont transférées dans des boîtes de 60 mm, tout en gardant la pression de sélection initiale. Les cellules sont maintenues durant cinq à dix passages (variable) à cette concentration pour stabiliser la population cellulaire. Le repiquage se fait au début environ toutes les trois semaines avec une dilution au 1/2 des cellules et un changement de milieu tous les trois à quatre jours. Après une stabilisation de la croissance cellulaire (repiquage en moyenne tous les 10 à 15 jours, observations également avec l'état général de la cellule), celles-ci sont soumises à des pressions croissantes en hygromycine B de l'ordre de 50 à 100 µg/ml selon les circonstances. La stabilisation de la cellule se faisant souvent après cinq passages sous la pression définie. L'ARN total des cellules poussant sous pression de sélection a été extrait et soumis à une RT-PCR (PCR à l'aide de la rétrotranscriptase) dans les régions 5' et 3' non codantes. Celles-ci s'étant révélées positives, la pression de sélection a été maintenue et élevée progressivement. Cependant les études par immunofluorescence indirecte n'ont pas permis la détection des protéines du VHC. La détection par immunofluorescence n'a été possible que pour des cellules poussant sous des pressions en hygromycine B supérieures à 600 µg/ml. Les cellules ont été également congelées à des pressions de sélection intermédiaires. Actuellement on dispose de cellules poussant sous une pression en hygromycine B de 1000 µg/ml.

## 5. Cellules et conditions d'entretien.

**Cellules Véro/G418 / Réplicon VHC :** Les cellules sont cultivées en couche mince dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup> et dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de l'hygromycine B. La concentration en hygromycine B dépend de la sélection de la cellule. Celle-ci varie de 200 à 1000 µg/ml. Les flacons de 75 cm<sup>2</sup> sont habituellementensemencés avec 5.10<sup>6</sup> cellules ce qui correspond à une dilution au demi et elles sont entretenues pendant 10 à 15 jours en fonction de leur densité. Au moment de leur passage, le milieu de ces cellules est éliminé et les cellules sont lavées deux fois par un milieu trypsine/versène (NaCl 8 g/l, KCl 0,4 g/l, dextrose 1 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 0,58 g/l, Trypsine cristallisée 0,045 g/l, Versène 0,2 g/l). Les cellules se décolent très rapidement après quelques minutes (2 à 5 minutes). On reprend alors ces cellules par du milieu DMEM contenant la concentration d'hygromycine B adéquate et les cellules sont réparties dans deux flacons. On laisse les cellules se fixer et s'établir sur le flacon et le milieu n'est changé que trois à quatre jours après, puis tous les deux ensuite jusqu'à la densité cellulaire voulue (8 à 10.10<sup>6</sup> cellules/flacon de 75 cm<sup>2</sup>).

## 6. Analyse des protéines par immunofluorescence indirecte.

Les cellules Véro/G418 sont cultivées sur lamelles de verre en absence d'hygromycine B et les cellules Véro/G418 + réplicon en présence d'hygromycine B (800 µg/ml). Après 3 jours de culture les cellules sont fixées dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. Les cellules fixées au paraformaldéhyde sont ensuite traitées par une solution de Triton X-100 pour favoriser le marquage intracellulaire. Les cellules sont ensuite mises en contact avec des anticorps spécifiques dirigés contre différentes protéines du VHC et dilués dans du TBS (Tris Buffered saline : 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 137 mM NaCl ; 2 mM EDTA). Ces anticorps sont soit des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de capsid, NS3 ou NS5 et préparés chez la souris, soit des anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine NS4 ou NS5A ou B et préparés chez le lapin, soit des anticorps anti-VHC provenant de patients infectés par le VHC. Après plusieurs rinçages, les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire couplé à la rhodamine (immunoglobulines anti-souris produites chez le lapin ; DAKO) ou à la fluorescéine (immunoglobulines anti-souris produites chez l'âne ; Jackson), ou des anticorps secondaires couplés à la rhodamine ou à la fluorescéine et reconnaissant les immunoglobulines de lapin ou les immunoglobulines

humaines. Les cellules ainsi marquées sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Zeiss) et photographiées (voir Figure 2).

## 7. Purification des ARN.

5           a) Selon la méthode décrite dans le kit Proméga (Kit SV "Total RNA Isolation System", système d'isolement de l'ARN total).

10           Les purifications d'ARN peuvent être effectuées sur  $1,5 \cdot 10^3$  à  $5 \cdot 10^6$  cellules. Les procédures d'extraction sont réalisées avec le kit de Proméga (SV Total RNA Isolation System) et décrit selon le manuel de Proméga. Pour les cellules adhérentes, le milieu est enlevé et les cellules sont lavées deux fois par une solution trypsine/verséne, une fois que les cellules ont été décrochées. Celles-ci sont ensuite reprises par le milieu de culture puis sont centrifugées à 300g pendant 5 minutes. Le milieu est ensuite aspiré et les cellules sont reprises dans une solution PBS et recentrifugées comme décrit précédemment. Le milieu est aspiré et le culot de cellules peut-être soit traité pour la

15           suite des manipulations soit conservé à  $-80^\circ\text{C}$ . La suite du protocole correspond à la description de la procédure de Proméga : le culot de cellules est repris par 175  $\mu\text{l}$  de la solution de lyse (SV RNA Lysis Buffer, fourni avec le Kit : 4M GTC (guanidine isothiocyanate) ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 0,97%  $\beta$ -mercaptoéthanol). Le culot est ensuite dispersé en pipettant plusieurs fois. Si la concentration de cellules est comprise

20           entre  $1 \cdot 10^6$  et  $5 \cdot 10^6$  cellules, il est nécessaire de casser l'ADN en le faisant passer au travers d'une aiguille très fine. On ajoute ensuite 350  $\mu\text{l}$  d'un tampon SV RNA Dilution Buffer (Proméga) au 175  $\mu\text{l}$  de la solution de lyse. On mélange en inversant le tube trois à quatre fois et le tube est placé ensuite dans un bain marie porté à  $70^\circ\text{C}$  et on laisse

25           incuber pendant 3 minutes (il ne faut pas dépasser ce temps afin de ne pas risquer de dégrader l'ARN). On centrifuge à 12000-14000 g pendant 10 minutes à  $20$ - $25^\circ\text{C}$  et on utilise les tubes qui sont donnés avec le kit, pour la suite de la manipulation. Par ailleurs, il est nécessaire d'identifier<sup>it</sup> chaque tube pour chaque préparation utilisée et de porter des gants pour éviter les contaminations RNases. La solution de lyse est transférée dans un autre tube à centrifuger et il faut éviter de remettre le culot en

30           suspension. 200  $\mu\text{l}$  d'éthanol à  $95^\circ\text{C}$  sont ajoutés à la solution aqueuse. On mélange en pipettant trois à quatre fois, puis cette solution est transférée sur une micro-colonne contenue dans le tube à centrifugation et on centrifuge à 12000-14000 g pendant une minute. On retire la micro-colonne du tube, le liquide présent dans le tube de collection

est éliminé puis on replace la micro-colonne sur le tube d'origine. On ajoute 600 µl de la solution de lavage des ARN sur la micro-colonne (solution de lavage des ARN : 60 mM acétate de potassium, 10 mM Tris-HCl pH7.5 et 60% Éthanol). On centrifuge à 12 000-14 000 g pendant une minute. Le tube de collection est à nouveau vidé et remplacé comme précédemment. Pour chaque préparation à purifier, la solution suivante est préparée (et dans l'ordre) : 40 µl Tampon Yellow (22,5 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1,125 M NaCl ; 0,0025% Yellow dye (Proméga) (w/ v), 5 µl 0,09M MnCl<sub>2</sub> et 5 µl DNase I enzyme. Le mélange ne doit pas être vortexé mais doit être mélangé doucement. Le tout est gardé dans la glace et si l'enzyme doit être décongelée, il faut la laisser dans la glace. Les 50 µl de cette solution sont ajoutés sur la membrane de la Spin Basket. Il est nécessaire de s'assurer que la solution couvre parfaitement la membrane. On laisse agir pendant 15 minutes à 20-25°C (température de la paillasse). Après ce temps d'incubation, on ajoute 200 µl d'une solution d'arrêt de l'activité enzymatique (SV DNase stop solution)(2M guanidine isothiocyanate, 4 mM Tris-HCl pH 7,5 et 57 % éthanol). La micro-colonne est centrifugée à 12 000-14 000 g pendant une minute. On ajoute 600 µl d'une solution de lavage des ARN (SV RNA wash solution) et on centrifuge à 12000-14000 g pendant une minute. On ajoute 250 µl de la solution de lavage des ARN. On centrifuge à vitesse maximale pendant deux minutes. On enlève un tube d'élution du kit initial pour chaque préparation et on transfère la micro-colonne dans un autre tube à centrifugation. On ajoute 100 µl d'eau traitée au DEPC sur la membrane de la micro-colonne. On centrifuge à 12000-14000g pendant une minute. La solution d'ARN est contenue dans le tube d'élution et est conservée à -80°C.

**b) Pour des quantités d'ARN plus importantes, on utilise le kit Promega (Total RNA isolation system, système d'isolement d'ARN total).**

Les valeurs données ici sont à utiliser pour 1.10<sup>7</sup> cellules. La préparation des cellules se fait de la même façon que décrite précédemment. Le principe d'extraction des ARN est basé sur la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) et qui utilise le guanidium de thiocyanate. Le culot de cellules est repris par 1,2 ml d'une solution de dénaturation contenant : 26 mM de citrate de sodium (pH 6,8), 0,5% N-lauryl sarcosine, 0,125 M β-mercaptoéthanol et 4M guanidine thiocyanate. La solution est séparée dans deux tubes eppendorf contenant ainsi 600 µl de la solution. On ajoute ensuite dans chaque tube 60 µl d'acétate de sodium 2M et on mélange doucement par retournement des tubes (4 à 5 fois). Cette solution est ensuite extraite par 600 µl de

phénol : chloroforme : IAA (alcool isoamylique) et les tubes sont ensuite placés dans la glace pendant 15 minutes. Après ce temps, la solution aqueuse est récupérée en centrifugeant les tubes pendant 30 minutes à 14000 tpm à 4°C dans une machine eppendorf. A la solution aqueuse, il faut ensuite ajouter un volume équivalent d'isopropanol et après avoir mélangé, on laisse le tout à -20°C pendant 15 minutes. On centrifuge à 14000 tpm à 4°C pendant 30 minutes pour récupérer le culot d'ADN qui sera lavé par une solution d'éthanol à 75%. On centrifuge à nouveau, puis on élimine l'éthanol, et on laisse sécher légèrement le culot que l'on reprendra dans 50 µl d'eau Rnase free (traitée au DEPC). Les solutions d'ARN purifiés peuvent être rassemblées entre elles. Les ARN sont ensuite conservés à -80°C.

**c) Purification des ARN par trifluoroacétate de Césium : CsTFA<sup>TM</sup> (produit Pharmacia)**

Des extraits d'ARN totaux préparés à partir de cellules ou dans certains cas à partir de biopsies par la méthode classique au guanidium de thiocyanate sont également purifiés par centrifugation sur trifluoroacétate de Césium (CsTFA) selon la procédure décrite par Zarlenga et Gamble (1987). Cela permet ainsi d'obtenir une préparation d'ARN dépourvue d'ADN, de protéines et dans certains cas de glycogène pour des ARN isolés à partir d'hépatocytes. L'ARN précédemment isolé par guanidium thiocyanate est ensuite purifié sur CsTFA (Pharmacia). L'ARN est repris par une solution de CsTFA à une densité de 2,0 g/ml pour être à la fin à une concentration de 1,65 g/ml et contenant du BET (bromure d'éthidium) à une concentration de 0,5 µg/ml. La solution contenue dans des tubes polyallomer (Beckman) de 5 ml est ensuite mise à centrifuger dans une SW 55 Ti rotor (Beckman) pendant 44 heures à 15°C et à 200000g. Après ce temps de centrifugation, l'ARN est prélevé et mis en précipitation dans une solution 0,3 M d'acétate de sodium et dans 2 volumes d'éthanol à -20°C pendant la nuit. On centrifuge ensuite pour récupérer le culot d'ARN, on lave ce culot par de l'éthanol à 70%, on sèche ensuite le culot et on reprend l'ARN par de l'eau traitée au DEPC. D'autres purifications ne sont plus nécessaires. L'ARN ainsi préparé peut-être utilisé pour les manipulations d'amplifications ou pour les manipulations d'hybridation sur filtres.



## 8. Hybridation de l'ARN total des cellules contenant le réplicon par des sondes radioactives.

**Préparation des filtres :** La dénaturation de l'ARN se fait par une solution de glyoxal, puis, après dénaturation, les ARN sont fixés sur des filtres de Nitrocellulose par aspiration (Appareil utilisé, BioDot SF de chez BioRad). Les ARN purifiés, comme précédemment décrits, sont traités comme suit : 22 µl d'ARN sont mélangés à 9 µl d'une solution 100 mM de phosphate de sodium (pH 7,0), 45 µl de DMSO (diméthyl sulfoxyde (Sigma)) et 13,2 µl d'une solution 6M glyoxal (Sigma). Le tout est mélangé puis centrifugé pour collecter la totalité du liquide. Le mélange formé par l'ARN et la solution dénaturante est ainsi incubé pendant une heure à 50°C, puis l'échantillon est refroidi dans la glace. Deux volumes d'une solution 20XSSC (3 M NaCl ; 0,3 M citrate de sodium pH 7,0) sont ensuite ajoutés à chaque échantillon avant leur passage sur la membrane de Nitrocellulose qui aura été au préalable traitée dans une solution 10XSSC (1,5 M NaCl ; 0,15 M citrate de sodium pH 7,0). Pour éliminer le restant de glyoxal, le filtre est passé dans une solution chauffée à 95°C : 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA et qui est laissée sous faible agitation à température de la pièce. Chaque filtre est ensuite placé dans un four sous vide (à 80°C) pendant une à deux heures.

**Préhybridation et hybridation des filtres :** On place le filtre à l'intérieur d'un sac plastique et on ajoute la solution de préhybridation (10 mM EDTA ; 7% SDS ; 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2). Le sac plastique est scellé et on laisse le tout en pré-hybridation pendant 5 minutes à 65°C. On coupe ensuite un coin du sac plastique et on enlève la solution de pré-hybridation. On ajoute ensuite la même solution dans le sac avec la sonde radioactive à 10<sup>6</sup> cpm/ml. On laisse ainsi le contenu en hybridation pendant 4 à 24 heures à 65°C.

**Lavage des filtres :** Différents lavages sont effectués : tout d'abord deux lavages pendant 5 à 10 minutes avec un mélange contenant une solution 2X SSC (0,3 M NaCl ; 0,03 M citrate de sodium pH 7,0) et du SDS 0,1%. On effectue ensuite deux lavages à 50°C pendant 15 minutes chacun avec un mélange contenant une solution 0,1X SSC (1,5.10<sup>-2</sup> M NaCl ; 1,5.10<sup>-3</sup> M citrate de sodium pH 7,0), du SDS 0,1 %.

### **III – Procédé de production du VHC par infection :**

Ce procédé permet de tester si les cellules contenant le réplicon peuvent produire des particules de VHC par infection.

Actuellement, il n'existe pas de système cellulaire capable de produire le virus de l'hépatite C. La mise en place de cellules capables de répliquer le génome du VHC implique la sélection de facteurs qui favorisent également la multiplication du virus. Une fois que de telles cellules ont permis une amplification virale, on peut envisager la purification du virus ainsi que l'inactivation de celui-ci pour des tests de vaccination.

Pour infecter des cellules à partir de stocks de virus de la souche H (Feinstone et al., 1981) (il s'agit de la même souche qui a été utilisée pour cloner l'ADNc complet du VHC), ou à partir de virus provenant de patients infectés, on utilise les cellules d'origine Véro/G418 (ou Vn5), les cellules Véro/G418 + réplicon sous pression d'hygromycine B ou les cellules Véro/G418 + réplicon sans pression d'hygromycine B. Ces cellules sont entretenues dans un milieu normal (DMEM/10% SVF) et sans hygromycine B afin d'atténuer l'action du réplicon. Une RT-PCR est réalisée sur le virus initial, ce qui permet de quantifier le matériel viral (présence d'ARN) sans pour autant déterminer son caractère infectieux. Les cellules sont ensuite infectées par les virus tels que mentionnés ci-dessus. Les cellules sont entretenues et étudiées à différents moments pour déterminer s'il y a amplification du matériel génétique du VHC. Pour cela, des prélèvements de cellules sont effectués et l'ARN total de ces cellules est extrait pour quantifier l'ARN du VHC soit par RT-PCR, soit par hybridation des ARN sur filtres. Par ailleurs, on cherche à savoir si le virus est capable de lyser les cellules ou s'il persiste dans la cellule. S'il y a lyse cellulaire, il suffit de reprendre les lysats cellulaires pour infecter d'autres cellules. La quantification du virus peut ensuite se faire par diverses méthodes utilisées en virologie. De plus, si l'infection virale ne conduit pas à une lyse des cellules, la multiplication du VHC peut s'observer par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines du VHC.

#### **IV – Test d'infektivité de l'ADNc complet du VHC reconstitué avec les séquences du réplicon par transfection de cellules :**

Il est indispensable de recloner les séquences des réplicons les plus fonctionnels, c'est-à-dire ceux qui ont montré la réplication la plus efficace en permettant à la cellule de résister à des concentrations d'hygromycine B très élevées. Ainsi, les ARN de ces cellules sont extraits selon les procédures décrites ci-dessus. L'ARN des réplicons est amplifié par RT-PCR en une seule étape, afin que l'ensemble des variations corresponde à la même molécule de réplicon. L'ADN est séquencé et l'ARN issu de la transcription de l'ADN est à nouveau transfecté pour vérifier son pouvoir réplicatif sur les cellules. Dans la séquence d'ADN ainsi obtenue, les séquences correspondant au gène de résistance à l'hygromycine B sont substituées par les séquences codant pour les protéines de structure du VHC. Ces séquences sont clonées dans un vecteur afin d'être capables de produire de l'ARN par transcription à partir d'ADN. Ces ADNc servent à produire de l'ARN pour transfecter par électroporation (voir plus haut) les cellules Véro/G418 (ou Vn5), les cellules Véro/G418 + réplicon sous pression d'hygromycine B ou les cellules Véro/G418 + réplicon sans pression d'hygromycine B. Les tests d'identification sont ensuite effectués comme décrit ci-dessus.

#### **V – Procédé de criblage d'agents anti-VHC :**

La croissance cellulaire sous des pressions élevées d'hygromycine B étant dépendante de l'efficacité de réplication du réplicon du VHC, on a testé différents agents anti-viraux du VHC qui peuvent inhiber soit directement soit indirectement la réplication du VHC.

Les cellules Véro/G418 + réplicon et les cellules témoins Véro/G418 (ou Vn5) sont soumises parallèlement à l'action de différents anti-viraux et à des concentrations variables. Toute action sur la réplication du réplicon a forcément une répercussion sur la synthèse des ARN du VHC et par conséquent sur la synthèse des protéines. Ainsi, les ARN totaux des cellules soumises à l'action des anti-viraux sont extraits, puis fixés sur des filtres et finalement hybridés avec des sondes spécifiques du VHC. Par ailleurs, la synthèse des protéines étant affectée par la diminution de la réplication, un marquage des protéines est effectué et l'expression des différentes protéines est étudiée par

immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines spécifiques du VHC.

On peut également utiliser un réplicon contenant dans sa séquence les séquences codant pour la GFP. On choisit pour cela une GFP dont le temps de demi-vie est court (Clontech). La régénération de cette protéine dépend du taux de synthèse mais également de la réplication du réplicon. Des inhibiteurs agissant sur la réplication du VHC affectent la synthèse des protéines et par conséquent celle de la protéine GFP. L'avantage de cette approche est qu'il n'est pas nécessaire de fixer les cellules pour détecter par immunofluorescence la GFP car celle-ci a la propriété de fluorescer naturellement sous certaines longueurs d'ondes. Les cellules contenant le réplicon et la GFP et soumises à l'action d'agents anti-viraux peuvent être observées à différents instants. Des photos peuvent être prises et on peut alors analyser l'immunofluorescence de la GFP. Toute diminution ou disparition de l'immunofluorescence de la GFP atteste de l'action d'anti-viraux du VHC.

#### **VI - Étude de la prénylation de la protéine NS5A du VHC de génotype 1a et 1b :**

Pour cette étude, différents virus recombinants vaccines ont été utilisés. Ils expriment la totalité de la protéine NS5A du VHC de génotype 1a ou de génotype 1b. Pour ce dernier génotype, les séquences codant pour la protéine NS5A ont été amplifiées à partir de deux patients infectés par le VHC de génotype 1b. Certaines constructions de la protéine NS5A du VHC contiennent des délétions de la séquence protéique localisée dans la partie amino terminale de la protéine. Ces différents virus recombinants correspondent à : vvNS5A.1a dl1 (del 1973-2100 aa), vvNS5A.1a dl2 (del 1973-2073 aa) et vvNS5A.1a dl3 (del 1973-2001 aa). Entre les parenthèses sont indiqués les acides aminés qui sont délétés dans la protéine NS5A. Pour plus de précisions, le chiffre qui correspond à la position de l'acide aminé dans la polyprotéine du VHC a été gardé. Ainsi, del 1973-2100 aa correspond à une délétion de la séquence peptidique comprise entre les acides aminés 1973 et 2100 de la polyprotéine du VHC. Cette délétion de la protéine concerne la partie amino-terminale de la protéine NS5A. Par ailleurs, un virus recombinant vaccine, vvNS2-5B, qui exprime les protéines NS2

jusqu'à la protéine NS5B du VHC, c'est-à-dire NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B, a également été utilisé.

Les cellules ainsi infectées sont utilisées pour effectuer des marquages métaboliques soit en présence d'acide mévalonique ( $H^3$ ) soit en présence de méthionine  $S^{35}$ . Les procédures utilisées pour ces marquages sont détaillées ci-après.

**a) Marquage à l'acide mévalonique ( $H^3$ ) des protéines :**

Des cellules Véro/G418 (Vn5) ont été ensemencées sur des plaques 6 puits (Costar) à  $10^6$  cellules/puits et dans un milieu DMEM (Milieu de Eagle modifié par Dubelcco) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Ces cellules sont placées dans une étuve à  $CO_2$  et à  $37^\circ C$  pendant 24 heures. Elles sont ensuite infectées soit avec le virus vTF7.3 seul (Fuerst et al., 1986), soit co-infectées par ce virus et un des virus recombinants exprimant la protéine NS5A du VHC précédemment décrit, chacun à une m.o.i. de 5 UFP/cellule. Après une heure à  $37^\circ C$ , l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10% de sérum de veau fœtal et 100  $\mu g/ml$  de Mévastatine pour un prétraitement de 4 heures à la suite duquel on ajoute dans le milieu 100  $\mu Ci/ml$  d'acide mévalonique ( $H^3$ ). Après 18 heures post-infection, les cellules sont lavées par du milieu DMEM, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées par une solution PBS avant d'être lysées par un tampon contenant : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 0,5% Na déoxycholate ; 0,2% SDS ; Aprotinine 10  $\mu g/ml$  ; TPCK et PMSF, 20  $\mu g/ml$ . La protéine NS5A du VHC est ensuite immunoprécipitée à partir de ce lysat à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la protéine NS5A selon une procédure déjà décrite (Wychowski et al., 1985) et le précipité est analysé par SDS-PAGE. Le résultat de ces marquages est indiqué dans les figures 3A, 3B, 3C et 3D. Les marquages à l'acide mévalonique sont indiqués par : Mev. $H^3$ . Dans les figures 3A, 3B et 3C, les lignes 1 indiquent le résultat obtenu sur un lysat provenant de cellules infectées par le virus recombinant vTF7.3. Il s'agit dans ce cas-là d'une mesure de contrôle.

**b) Marquage ( $S^{35}$ ) des protéines :**

Des cellules Véro/G418 (Vn5) ont été infectées avec les mêmes virus recombinants que ceux cités précédemment. Après une heure de mise en contact à  $37^\circ C$ , l'inoculum est retiré et remplacé par du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal. A 16h post-infection, les cellules sont lavées par du milieu DMEM sans méthionine, puis incubées dans ce milieu pendant 1 à 2 heures, puis marquées 3 heures

avec 100  $\mu\text{Ci/ml}$  de méthionine ( $^{35}\text{S}$ ) ( $^{35}\text{S}$ -Protein Labeling Mix (NEN), solution de marquage). Après ce temps, le milieu est éliminé et les cellules sont ensuite lavées par du PBS, et finalement sont lysées à l'aide d'un tampon de lyse contenant : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 0,5% Na déoxycholate ; 0,2% SDS ; Aprotinine 10  $\mu\text{g/ml}$  ; TPCK et PMSF, 20  $\mu\text{g/ml}$ . La protéine NS5A du VHC est ensuite immunoprécipitée à partir des lysats à l'aide d'un sérum polyclonal de lapin comme décrit par Wychowski et al. (1985) et le précipité est analysé par SDS-PAGE. Les marquages à la méthionine  $\text{S}^{35}$  sont indiqués dans les figures 3A et 3C par : Met. $\text{S}^{35}$ . Dans les figures 3A et 3C, les lignes 1 indiquent le résultat obtenu sur un lysat provenant de cellules infectées par le virus recombinant vTF7.3 et marquées à la méthionine  $\text{S}^{35}$ . Il s'agit dans ce cas-là d'une mesure de contrôle.

On remarque que la protéine NS5A du VHC de génotype 1a ou 1b est prénylée dans les cellules Véro/G418 (Vn5) (voir figures 3A et 3D). Cette prénylation a lieu lorsque la protéine NS5A est exprimée seule ou dans le contexte de la polyprotéine (voir figures 3B, lignes 2 et 3 respectivement). La prénylation est un processus de modification post-traductionnelle concernant principalement la protéine NS5A du VHC de génotype 1a ou 1b, et peut concerner les autres génotypes.

## RÉFÉRENCES

- 5      – Blackburn P. and Moore S. (1982) *The Enzymes*, Vol. XV, Part. B, Academic Press, BY,
- 10     – Bouffard et al. (1992) *The J. Infect. Diseases*, **166**, 1276-1280,  
– Casey P.J. (1992) *Journal of Lipid Research*, **33**, 1731-1740,  
– Chomczynski et Sacchi (1987) *Anal. Biochem*, **162**, 156-159,  
– Choo et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2451-2455,  
– Choo et al. (1989) *Science*, **244**, 359-362,  
– Feinstone et al. (1975) *N. Engl. J. Med.*, **292**, 767-770,  
– Feinstone et al. (1981) *J. Infect. Dis.*, **144**, 588-598,  
– Fourmillier et al. (1996) *J. Gen. Virol.*, **77**, 1055-1064,  
– Frese et al. (1995) *J. Virol.*, **69**, 3904-3909,  
15     – Fuerst et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8122-8126,  
– Grakoui et al. (1993) *J. Virol.*, **67**, 1385-1395,  
– Grakoui et al. (1993) *J. Virol.*, **67**, 2832-2843,  
– Grakoui et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10583-10587,  
– Gübler U. and Hoffman B.J. (1983) *Gene*, **25**, 263-269,  
20     – Hijikata et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5547-5551,  
– Inchauspé et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10292-10296,  
– Kato and Shimotohno (2000) *Curr Top Microbiol Immunol*, **242**, 261-278,  
– Kato et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9524-9528,  
– Kieny et al. (1984) *Nature*, **312**, 163-166,  
25     – Kolykhalov et al. (1997) *Science*, **277**, 570-574,  
– Kowalski et al. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4457-4463,  
– Lanford et al. (1994) *Virology*, **202**, 606-614,  
– Liljeström et al (1991) *J. Virol.*, **65**, 4107-4113,  
– Lohmann et al. (1997) *Science*, **285**, 110-113,  
30     – Moss et al. (1990) *Nature*, **348**, 91-92,  
– Mullis, K.B. and Faloona F.A. (1987) *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350,  
– Negro et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, **89**, 2247-2251,  
– Okamoto et al. (1992) *Virology*, **188**, 331-341,

- Prince et al. (1974) *Lancet*, **2**, 241-246,
- Reynolds et al. (1995) *The EMBO J.*, **14**, 6010-6020,
- Seipp et al. (1997) *J. Gen. Virol.*, 2467-2476,
- Shimizu et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5477- 5481,
- 5 - Shimizu et al. (1994) *J. Virol.*, **68**, 1494-1500,
- Shimizu et al. (1994) *J. Virol.*, **68**, 8406-8408,
- Simmonds P. (2001) *J. Gen. Virol.*, **82**, 693-712,
- Tsukiyama-Kohara et al. (1992) *J. Virol.*, **66**, 1476-1483,
- Wychowski et al. (1985), *Gene*, **37**, 63-71,
- 10 - Yanagi et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8738-8743,
- Zarlenga et Gamble (1987) *Analytical Biochemistry*, **162**, 569-574.



## REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de cellules capables d'effectuer un processus de prénylation de protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C (VHC), telle que la prénylation de la protéine NS5A, pour la réplication et, le cas échéant, la production du VHC ou de mutants viables dérivés, dans un milieu de culture approprié.

10 2. Utilisation selon la revendication 1, de cellules de mammifères, notamment de cellules de reins de singes, encore désignées cellules Véro.

15 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 2, de cellules Véro transformées par un gène de résistance à un antibiotique, tel que la néomycine, notamment de cellules Véro/G418.

20 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de cellules, telles que les cellules Véro, le cas échéant transformées par un gène de résistance à un antibiotique, tel que la néomycine, lesdites cellules étant transformées par un acide nucléique contenant tout ou partie du génome du VHC ou des mutants dérivés du VHC.

5 25 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'acide nucléique est choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC.

30 6. Utilisation selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce que les cellules sont transformées par un acide nucléique choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, pour la réplication, et le cas échéant, la production du VHC de type 1a.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, de cellules telles que déposées à la CNCM le 13 avril 2001 sous les numéros I-2658 et I-2659.

9. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par SEQ ID NO : 1.

10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par SEQ ID NO : 3.

11. Vecteur recombinant, notamment plasmide, cosmide, phage ou ADN de virus, contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 9 ou 10.

12. Cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 11.

13. Cellule transformée constituée par une cellule Véro/G418, comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC.

14. Cellule selon la revendication 13, constituée par une cellule Véro/G418 comprenant un réplicon constitué par un acide nucléique choisi parmi ceux contenant un gène de résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC, à savoir NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

15. Cellule selon l'une des revendications 13 ou 14, telle que la cellule Véro/G418 déposée à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2659.

16. Cellule selon l'une des revendications 13 à 15, telle que la cellule Véro/G418, comprenant un acide nucléique contenant un gène de résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC, et déposée à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2658.

17. Cellule selon l'une des revendications 13 à 16, constituée par une cellule Véro/G418 comprenant un acide nucléique contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales, et ayant la propriété de répliquer le VHC à une concentration d'antibiotique, notamment d'hygromycine B, de 800 à 1000 µg/ml.

18. Procédé de production du virus de l'hépatite C, qui comprend l'infection de cellules Véro/G418, notamment de cellules Véro/G418 telles que déposées à la CNCM le 13 avril 2001 sous le numéro I-2659, par le virus de l'hépatite C et la mise en culture dans des conditions appropriées de ces cellules infectées.

19. Procédé de réplication du virus de l'hépatite C par transformation de cellules Véro/G418 soit avec un acide nucléique tel que défini dans la revendication 9 ou 10, soit avec un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par SEQ ID NO : 2, et notamment par transformation des cellules Véro/G418 telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2659, pour obtenir des cellules Véro/G418 transformées, notamment celles déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2658, et par mise en culture de ces cellules transformées dans des conditions appropriées.

20. Procédé de production du virus de l'hépatite C par transformation de cellules Véro/G418, notamment de cellules Véro/G418 telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2659, avec un acide nucléique codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC, par la mise en culture dans des

conditions appropriées des cellules Véro/G418 transformées et la récupération des particules de virus VHC.

21. Procédé de criblage d'agents anti-VHC, qui comprend les étapes suivantes :

– la mise en présence du composé testé pour ses propriétés anti-VHC avec des cellules transformées, constituées par des cellules Véro/G418, comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à un antibiotique, notamment l'hygromycine B, et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC,

et notamment avec des cellules telles que déposées le 13 avril 2001 à la CNCM sous le numéro I-2658,

– l'extraction des ARN totaux sur lesdites cellules, et

– l'analyse de l'éventuelle diminution du taux de synthèse de l'ARN du VHC desdites cellules par rapport à une valeur de contrôle correspondant aux taux de synthèse des ARN du VHC des cellules en l'absence dudit composé testé.

22. Procédé de préparation de cellules Véro/G418 comprenant un acide nucléique choisi parmi :

- ceux codant pour les protéines structurales et non structurales du VHC ou
- ceux codant pour les protéines non structurales du VHC ou
- les réplicons contenant un gène de résistance à l'hygromycine B et une séquence nucléotidique codant pour les protéines non structurales du VHC,

ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

\* l'insertion d'une des séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 9 à 11 dans les cellules Véro/G418,

\* la soumission des cellules ainsi obtenues à des concentrations d'hygromycine B croissantes, notamment de 800 à 1000 µg/ml.

23. Cellules telles qu'obtenues par mise en œuvre du procédé selon la revendication 22.

1/3

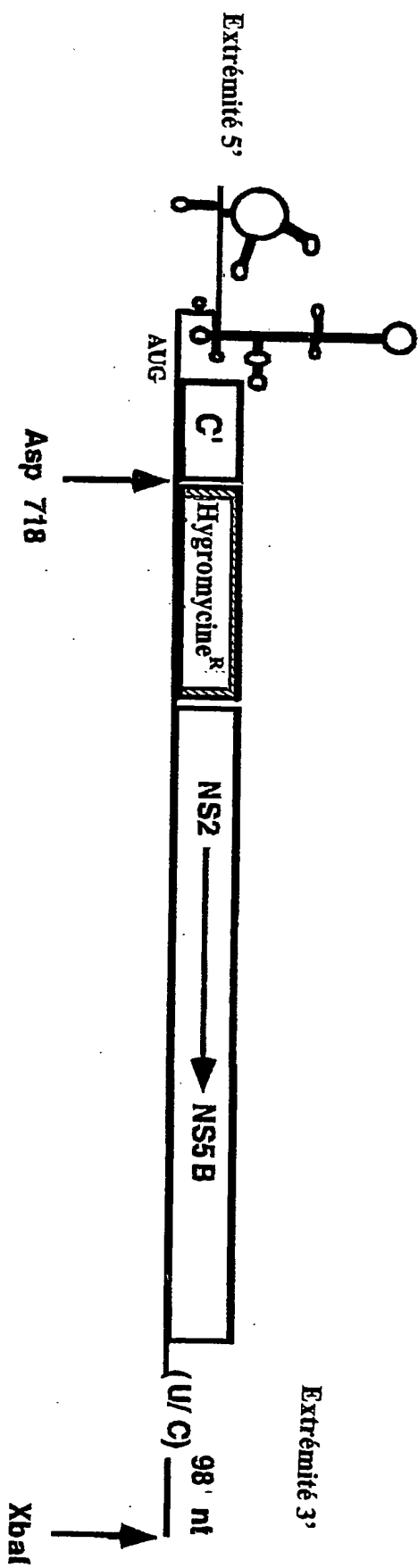
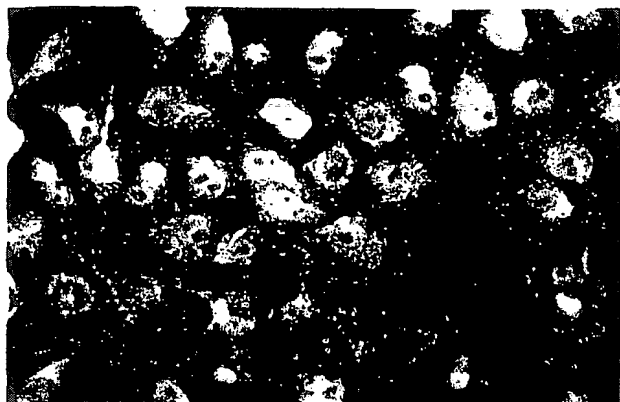
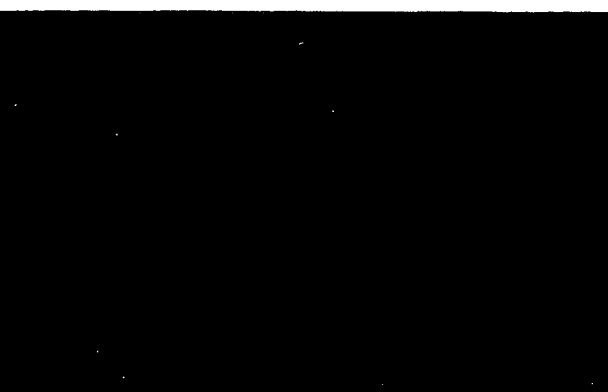
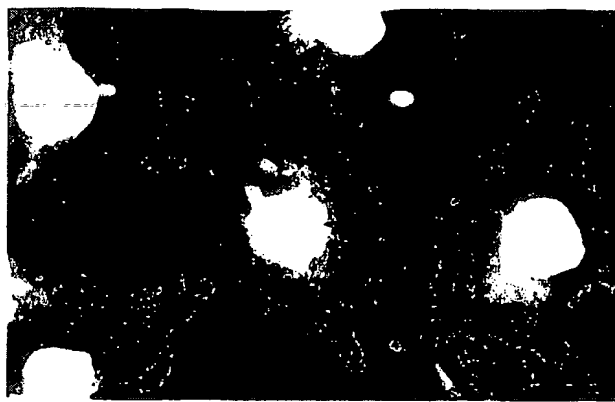


FIGURE 1

**A**



**B**



**C**

**D**

**FIGURE 2**

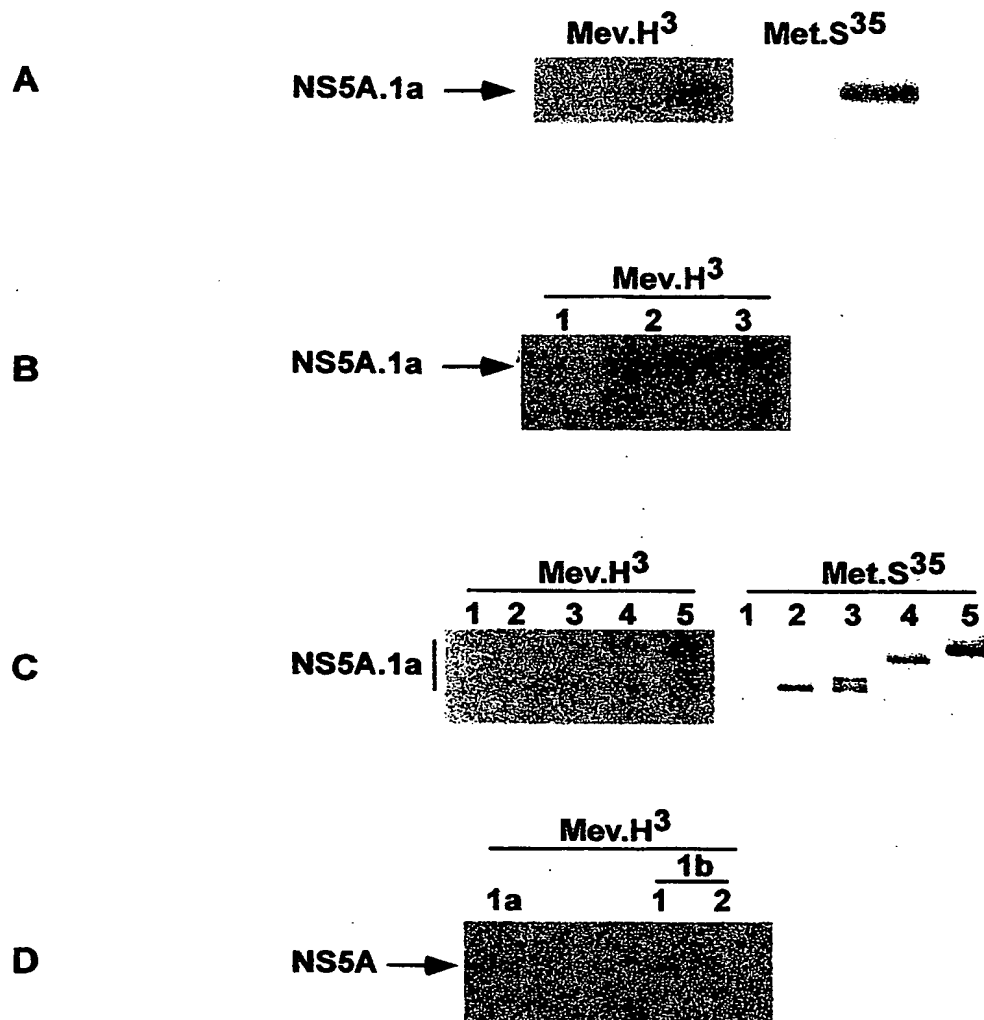


FIGURE 3

## LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS

<120> PROCEDE DE REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C

<130> WOB 01 AA CNR GENO

<150> FR 01/05732

<151> 2001-04-27

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6609

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> fragment de la séquence nucléotidique du VHC de génotype 1a

<400> 1

ctggacacgg	aggtggccgc	gtcgtgtggc	ggcgttgttc	ttgtcgggtt	aatggcgctg	60
actctgtcac	catattacaa	gcgctatata	agctgggtgca	tgtgggtggct	tcagtatttt	120
ctgaccagag	tagaagcgca	actgcacgtg	tgggttcccc	ccctcaacgt	ccgggggggg	180
cgcgatgccg	tcatcttact	catgtgtgtt	gtacacccga	ctctgggtatt	tgacatcacc	240
aaactactcc	tggccatctt	cggaccctt	tggattcttc	aagccagttt	gtttaaagtc	300
ccctacttcg	tgcgcgttca	aggccttctc	cggatctgcg	cgctagcgcg	gaagatgacc	360
ggaggtcatt	acgtgcaa	ggccatcatc	aagtgggggg	cgcttactgg	cacctatgtg	420
tataaccatc	tcacccctct	tcgagactgg	gcgacacaacg	gcctgcgaga	tctggccgtg	480
gctgtggaac	cagtcgtctt	ctcccgaatg	gagaccaagc	tcatacacgtg	gggggcagat	540
accgcccgtg	gcggtgacat	catcaacggc	ttgcccgtct	ctgcccgtag	ggggccaggag	600
atactgcttg	ggccagccga	cggaaatggtc	tccaaggggt	ggaggttgct	ggcgcccatc	660
acggcgtaac	cccagcagac	gagaggcctc	ctagggtgta	taatcaccag	cctgactggc	720
cgggacaaaa	accaagtgga	gggtgaggtc	cagatcgtgt	caactgctac	ccaaaccttc	780
ctggcaacgt	gcatcaatgg	ggtatgctgg	actgtctacc	acggggccgg	aacgaggacc	840
atcgcatcac	ccaagggtcc	tgtcatccag	atgtatacca	atgtggacca	agaccttgtg	900
ggctggcccc	ctcctcaagg	ttcccgtcca	ttgacaccct	gcacctgcgg	ctcctcgagc	960
ctttacctgg	tcacgaggca	cgccgacgtc	attcccgtgc	gccggcgagg	tgatagcagg	1020
ggtagcctgc	ttttgccccg	gcccatttcc	tacctaaaag	gctcctcggg	gggtccgctg	1080
ttgtgccccg	cgggacacgc	cgtgggccta	ttcaggggccg	cggtgtgcac	ccgtggagtg	1140
gccaaggcgg	tggactttat	ccctgtggag	aacctagaga	caacctagag	atccccgggtg	1200
ttcacggaca	actcctctcc	accagcagtg	ccccagagct	tccaggtggc	ccacctgcat	1260
gctcccaccg	gcagtggtaa	gagcaccaag	gtcccggctg	cgtagcgagc	ccagggctac	1320
aagggtgttg	tgtcaaccc	ctctgttgct	gcaacgctgg	gctttggtgc	ttacatgtcc	1380
aaggcccatg	gggtcgatcc	taatatacag	accgggggtga	gaacaattac	cactggcagc	1440
cccatcacgt	actccaccta	cggcaagttc	cttgccgacg	gcgggtgctc	aggaggcgct	1500
tatgacataa	taatttgtga	cgagtgccac	tccacggatg	ccacatccat	cttgggcac	1560
ggcactgtcc	ttgaccaagc	agagactgcg	ggggcgagat	tggttgtgct	cgccactgct	1620
accctcccg	gctccgtcac	tgtgtcccat	cctaacatcg	aggaggttgc	tctgtccacc	1680
accggagaga	tccctttcta	cggcaaggct	atccccctcg	aggtgatcaa	ggggggaaga	1740
catctcatct	tctgtcactc	aaagaagaag	tgcgacgagc	tcgccgcgaa	gctggtcgca	1800
ttgggcatca	atgccgtggc	ctactaccgc	ggacttgacg	tgtctgtcat	cccgaccagc	1860
ggcgatgttg	tcgtcgtgtc	gaccgatgct	ctatgactg	gctttaccgg	cgacttcgac	1920
tctgtgatag	actgcaacac	gtgtgtcact	cagacagtcg	atttcagcct	tgacctacc	1980
tttaccattg	agacaaccac	gctccccag	gatgtgtct	ccaggactca	gcgccggggc	2040
aggactggca	gggggaagcc	aggcatctac	agatttgtgg	caccggggga	gcgcccctcc	2100
ggcatgttcg	actcgtccgt	cctctgtgag	tgtatgacg	cgggctgtgc	ttggtatgag	2160
ctcatgcccc	ccgagactac	agttaggcta	cgagcgtaca	tgaacacccc	ggggcttccc	2220



gtgtgccagg	accatcttga	atthttgggag	ggcgtcttta	cgggcctcac	ccatatagat	2280
gcccactttc	tatcccagac	aaagcagagt	ggggagaact	ttccttacct	ggtagcgtac	2340
caagccaccg	tgtgcgctag	ggctcaagcc	cctcccccat	cgtgggacca	gatgtggaag	2400
tgtttgatcc	gccttaaacc	cacctcccat	gggccaacac	ccctgctata	cagactgggc	2460
gctgttcaga	atgaagtcac	cctgacgcac	ccaatcacca	aatacatcat	gacatgcatg	2520
tgggccgacc	tggaggtcgt	cacgagcacc	tgggtgctcg	ttggcggcgt	cctggctgct	2580
ctggccgcgt	attgcctgtc	aacaggctgc	gtggctcatag	tgggcaggat	tgtcttgtcc	2640
gggaagccgg	caattatacc	tgacagggag	gttctctacc	aggagttcga	tgagatggaa	2700
gagtgtcttc	agcacttacc	gtacatcgag	caagggatga	tgctcgctga	gcagttcaag	2760
cagaaggccc	tgggcctcct	gcagaccgcg	tcccgcctatg	cagaggttat	caccctgct	2820
gtccagacca	actggcagaa	actcgaggte	ttctgggcga	agcacatgtg	gaatttcac	2880
agtgggatac	aattatttggc	gggcctgtca	acgctgcctg	gtaaccccg	cattgcttca	2940
ttgatggctt	ttacagctgc	cgtcaccagc	ccactaacca	ctggccaaac	cctcctcttc	3000
aacatatttg	gggggtgggt	ggctgccag	ctcgccgccc	ccggtgccgc	taccgccttt	3060
gtgggcgctg	gcttagctgg	cgccgccatc	ggcagcgttg	gactggggaa	ggctcctcgtg	3120
gacattcttg	cagggtatgg	cgcgggcgctg	gcgggagctc	ttgtagcatt	caagatcatg	3180
agcgtgagg	tccctccac	ggaggacctg	gtcaatctgc	taccgcctat	cctctcgct	3240
ggagcccttg	tagtcggtgt	ggtctgcgca	gcaatactgc	gccggcacgt	tggcccgggc	3300
gagggggcag	tgcaatggat	gaaccggcta	atagccttcg	cctcccgggg	gaaccatgtt	3360
tccccacgc	actacgtgcc	ggagagcgat	gcagccgccc	gcgtcactgc	catactcagc	3420
agcctcactg	taaccagct	cctgaggcga	ctacatcagt	ggataagctc	ggagtgtacc	3480
actccatgct	ccggctcctg	gctaaggggac	atctgggact	ggatatgcga	ggtgctgagc	3540
gactttaaga	cctggctgaa	agccaagctc	atgccacaac	tgcttgggat	tccctttgtg	3600
tctgccagc	gcgggtatag	gggggtctgg	cgaggagacg	gcattatgca	cactcgctgc	3660
cactgtggag	ctgagatcac	tggacatgtc	aaaaacggga	cgatgaggat	cgtcggtcct	3720
aggacctgca	ggaacatgtg	gagtgggacg	ttccccatta	acgcctacac	cacgggcccc	3780
tgtactcccc	ttcctgcgcc	gaactataag	ttcgcgctgt	ggaggggtgtc	tgacagggaa	3840
tacgtggaga	taaggcggtg	gggggacttc	factacgtat	cgggtatgac	tactgacaat	3900
cttaaatgcc	cggtccagat	ccatcgccc	gaatttttca	cagaattgga	cgggggtgcgc	3960
ctacataggt	ttgcgcccc	ttgcaagccc	ttgctgcggg	aggaggtatc	attcagagta	4020
ggactccacg	agtacccggt	ggggctcgcaa	ttaccttgcg	agcccgaacc	ggacgtagcc	4080
gtgttgacgt	ccatgctcac	tgatccctcc	catataacag	cagaggcggc	cgggagaagg	4140
ttggcgagag	ggtcaccccc	ttctatggcc	agctcctcgg	ccagccagct	gtccgctcca	4200
tctctcaagg	caacttgac	cgccaaccat	gactccccctg	acgccgagct	catagaggct	4260
aacctcctgt	ggaggcagga	gatgggcggc	aacatcacca	gggttgagtc	agagaacaaa	4320
gtggtgattc	tggactcctt	cgatccgctt	gtggcagagg	aggatgagcg	ggaggtctcc	4380
gtaccgcgag	aaattctcgg	gaagtctcgg	agattcgccc	gggcctgcc	cgtttgggcg	4440
cggccggact	acaaccccc	gctagttagag	acgtggaaaa	agcctgacta	cgaaccacct	4500
gtggtccatg	gctgcccgt	accacctcca	cggctcccctc	ctgtgcctcc	gcctcggaag	4560
aagcgtacgg	tggctcctcac	cgaatcaacc	ctacctactg	ccttggccga	gcttgccacc	4620
aaaagtthttg	gcagctcctc	aacttcgggc	attacgggcg	acaatatgac	aacatcctct	4680
gagcccgccc	cttctggctg	cccccccgac	tccgacgttg	agtcctatc	ttccatgccc	4740
cccctggagg	gggagcctgg	ggatccggat	ttcagcgacg	ggtcatggtc	gacggtcagt	4800
agtggggccg	acacggaaga	tgctgtgtgc	tgctcaatgt	cttataacctg	gacaggcgca	4860
ctcgtcacc	cgtgcgctgc	ggaagaacaa	aaactgccc	tcaacgcact	gagcaactcg	4920
ttgctacgcc	atcacaaact	ggtatatctc	accacttcac	gcagtgttg	ccaaaggcag	4980
aagaaagtca	catctgacag	actgcaagtt	ctggacagcc	attaccagga	cgtgctcaag	5040
gaggtcaaa	cagcggcgtc	aaaagtgaag	gctaacttgc	tatccgtaga	ggaagcttgc	5100
agcctgacgc	ccccacattc	agccaaatcc	aagtttggct	atggggcaaa	agacgtccgt	5160
tgccatgcca	gaaaggccgt	agccacatc	aactccgtgt	ggaaagacct	tctggaagac	5220
agtgtaacac	caatagacac	tatcatcatg	gccaaagacg	aggtcttctg	cgttcagcct	5280
gagaaggggg	gtcgtaagcc	agctcgtctc	atcgtgttcc	ccgacctggg	cgtgcgctg	5340
tgcgagaaga	tggccctgta	cgacgtgggt	agcaaactcc	ccctggccgt	gatgggaagc	5400
tcttacggat	tccaaatactc	accaggacag	cgggttgaat	tcctcgtgca	agcgtggaag	5460
tccaagaaga	ccccgatggg	gttcccgtat	gatacccgct	gttttgactc	cacagtcact	5520
gagagcgaca	tccgtacgga	ggaggcaatt	taccaatgtt	gtgacctgga	cccccaagcc	5580
cgcgtggcca	tcaagtccct	cactgagagg	ctttatgttg	ggggccctct	taccaattca	5640
aggggggaaa	actgcggcta	tgcaggtgc	cgcgcgagcg	gcgtactgac	aactagctgt	5700
ggtaacaccc	tacttgcta	catcaaggcc	cgggcagccc	gtcgagccgc	agggctccag	5760
gactgcacca	tgctcgtgtg	tggcgacgac	ttagtcgtta	tctgtgaaag	tgcgggggctc	5820
caggaggacg	cggcgagcct	gagagccttt	acggaggcta	tgaccaggta	ctccgcccc	5880

cccggggacc	ccccacaacc	agaatacgac	ttggagctta	taacatcatg	ctcctccaac	5940
gtgtcagtcg	cccacgacgg	cgctggaaaa	agggctctact	accttaccgg	tgaccctaca	6000
acccccctcg	cgagagccgc	gtgggagaca	gcaagacaca	ctccagtcac	ttcctggcta	6060
ggcaacataa	tcatgtttgc	ccccacactg	tgggcgagga	tgatactgat	gacccatttc	6120
tttagcgtcc	tcatagccag	ggatcagctt	gaacaggctc	ttaaactgtg	gatctacgca	6180
gcctgctact	ccatagaacc	actggatcta	cctccaatca	ttcaaagact	ccatggcctc	6240
agcgcatttt	cactccacag	ttactctcca	ggtgaagtca	atagggtggc	cgcatgcctc	6300
agaaaacttg	gggtcccggc	cttgcgagct	tggagacacc	gggcccggag	cgcccgcgct	6360
aggcttctgt	ccagggggag	cagggctgcc	atatgtggca	agtacctctt	caactgggca	6420
gtaagaacaa	agctcaaac	cactccaata	gcgcccgctg	gccggctgga	cttgtccggt	6480
tgggtcacgg	ctgggtacag	cgggggagac	atttatcaca	gcgtgtctca	tgcccggccc	6540
cgctggttct	ggttttgctt	actcctgctc	gctgcagggg	taggcatcta	cctcctcccc	6600
aaccggtga						6609

<210> 2  
 <211> 9622  
 <212> ADN  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 2

gccagccccc	tgatgggggc	gacactccac	catagatcac	tccccctgtga	ggaactactg	60
tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgctcgtgcag	cctccaggac	120
ccccccctccc	gggagagcca	tagtggtctg	cggaaccggg	gagtacaccg	gaattgccag	180
gacgaccggg	tcctttcttg	gataaaccgg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
gcaagactgc	tagccgagta	gtgttggggc	gcgaaaggcc	ttgtggtact	gcctgatagg	300
gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaacc	360
ctcaaagaaa	aaccaaact	aacaccaacc	gtcgcccaca	ggacgtcgag	ttcccgggtg	420
gcggtcagat	cggttggtga	gtttacttgt	tgcgcgcag	gggccctaga	ttgggtgtgc	480
gcgcgacgag	gaagacttcc	gagcggctgc	aacctcgtgg	tagacgtcag	cctatcccca	540
aggcacgtcg	gcccgggggc	aggacctggg	ctcagcccgg	gtacccttgg	ccctctatg	600
gcaatgaggg	ttgcgggtgg	gcgggatggc	tcctgtctcc	ccgtggctct	cgccctagct	660
ggggcccccac	agacccccgg	cgtaggtcgc	gcaatttggg	taaggctcat	gataccctta	720
cgtgcggctt	cgccgacctc	atggggatca	taccgctcgt	cggcgcccct	cttgaggcg	780
ctgccagggc	cctggcgcat	ggcgctccgg	ttctggaaga	cggcgtgaac	tatgcaacag	840
ggaaccttcc	tggttgctct	ttctctatct	tccttctggc	cctgctctct	tgccctgactg	900
tgcccgttcc	agcctaccaa	gtgcgcaatt	cctcggggct	ttaccatgtc	accaatgatt	960
gccctaattc	gagtattgtg	tacgaggcgg	ccgatgccat	cctgcacact	ccggggtgtg	1020
tcccttgctg	tcgcgagggg	aacgcctcga	ggtgttgggg	ggcgggtgac	cccacgggtg	1080
ccaccaggga	cggcaaacct	cccacaacgc	agcttcgacg	tcatatcgat	ctgcttgtcg	1140
ggagcgccac	cctctgctca	gccctctacg	tgggggacct	gtgcgggtct	gtttttcttg	1200
ttggtcaact	gtttaccttc	tctcccaggc	gccactggac	gacgcaaagc	tgcaattggt	1260
ctatctatcc	cggccatata	acgggtcacc	gcatggcatg	ggatatgatg	atgaactggt	1320
cccctacggc	agcgttggtg	gtagctcagc	tgctccggat	cccacaagcc	atcatggaca	1380
tgatcgctgg	tgctcactgg	ggagtcctgg	cgggcatagc	gtatttctcc	atggtgggga	1440
actgggcgaa	ggtcctggtg	gtgctgctgc	tatttgcggg	cgctcgacgc	gaaaccacgc	1500
tcaccggggg	aagtgccggc	cacaccacgg	ctgggcttgg	tggtctcctt	acaccaggcg	1560
ccaagcagaa	catccaactg	atcaacacca	acggcagttg	gcacatcaat	agcacggcct	1620
tgaactgcaa	cgatagcctt	accaccggct	ggttagcagg	gctcttctat	cgccacaaat	1680
tcaactcttc	aggctgtcct	gagaggttgg	ccagctgccc	acgccttacc	gattttgccc	1740
agggtcgggg	tcccatcagt	tatgccaacg	gaagcggcct	tgacgaacgc	ccctactggt	1800
ggcactaccc	tccaagacct	tgtggcattg	tggccgcaaa	gagcgtgtgt	ggcccgggat	1860
attgcttcac	tcccagcccc	gtgggtgggtg	gaacgaccga	caggtcgggc	gcgcctacct	1920
acagctgggg	tgcaaatgat	acggatgtct	tcgtccttaa	caacaccagg	ccaccgctgg	1980
gcaattgggt	cggttggtacc	tggttggaact	caactggatt	caccaaagtg	tgccggagcgc	2040
ccccttggtg	catcgagggg	gtgggcaaca	acaccttgct	ctgcccact	gattgcttcc	2100
gcaaacatcc	ggaagccaca	tactctcggt	gcggtccgg	tccttggtat	acaccagggt	2160
gcatggtcga	ctaccggtat	aggctttggc	tactatcctt	tactatcaat	tacaccatat	2220
tcaaagtcag	gatgtacgtg	ggaggggtcg	agcacaggct	ggaagcggcc	tgcaactgga	2280
cgcggggcga	acgctgtgat	ctggaagaca	gggacaggct	cgagctcagc	ccattgctgc	2340
tgtccaccac	acagtggcag	gtccttcctg	gttttttcc	gacctgccca	gccttgtcca	2400

ccggcctcat	ccacctccac	cagaacattg	tggacgtgca	gtacttgtac	ggggtggggt	2460
caagcatcgc	gtcctgggcc	attaagtggg	agtacgtogt	tctcctgttc	cttctgcttg	2520
cagacgcgcg	cgtctgctcc	tgcttggtga	tgatgttact	catacccaa	gcggaggcgg	2580
ctttggagaa	cctcgtata	ctcaatgcag	catccctggc	cgggacgcac	ggtcttgtgt	2640
ccttcctcgt	gttcttctgc	tttgctgggt	atctgaagg	taggtgggtg	cccggagcgg	2700
tctacgcctt	ctacgggatg	tggcctctcc	tctgtctcct	gctggcgttg	cctcagcggg	2760
catacgact	ggacacggag	gtggccgcgt	cgtgtggcgg	cgttgttctt	gtcgggttaa	2820
tggcgctgac	tctgtcacca	tattacaagc	gctatatcag	ctggtgcatg	tgggtgcttc	2880
agtattttct	gaccagagta	gaagcgcaac	tgcacgtgtg	ggttcccccc	ctcaacgtcc	2940
ggggggggcg	cgatgccgtc	atcttactca	tgtgtgttgt	acacccgact	ctggtatttg	3000
acatcaccaa	actactcctg	gccatcttcg	gacccctttg	gattcttcaa	gccagtttgt	3060
ttaaagtcct	ctacttcgtg	cgcgttcaag	gccttctcgg	gatctgcgcg	ctagcgcgga	3120
agatgaccgg	aggtcattac	gtgcaaattg	ccatcatcaa	ggtggggggc	cttactggca	3180
cctatgtgta	taaccatctc	acccctcttc	gagactgggc	gcacaacggc	ctgcgagatc	3240
tggcgtggc	tgtggaacca	gtcgtcttct	ccgaatgga	gaccaagctc	atcacgtggg	3300
gggcagatac	cgccgcgtgc	ggtgacatca	tcaacggctt	gcccgtctct	gcccgtaggg	3360
gccaggagat	actgcttggg	ccagccgacg	gaatggtctc	caaggggtgg	aggttgctgg	3420
gcgccatcac	ggcgtacgcc	cagcagacga	gaggcctcct	aggtgtata	atcaccagcc	3480
tgactggccg	ggacaaaaac	caagtggagg	gtgaggtcca	gatcgtgtca	actgctaccc	3540
aaaccttctt	ggcaacgtgc	atcaatgggg	tatctggac	tgtctaccac	ggggccggaa	3600
cgaggaccat	cgcatacccc	aagggtcctg	tcatccagat	gtataccaat	gtggaccaag	3660
accttgtggg	ctggcccgtc	cctcaagggt	cccgctcatt	gacaccctgc	acctgcggct	3720
cctcggaact	ttacctggtc	acgaggcacg	ccgacgtcat	tcccgtgcgc	cggcgaggtg	3780
atagcagggg	tagcctgctt	ttgcccgggc	ccatttctta	cctaaaaggc	tcctcggggg	3840
gtccgctgtt	gtgcccgcgc	ggacacgcgc	tgggcctatt	cagggccgcg	gtgtgcaccc	3900
gtggagtggc	caaggcggtg	gactttatcc	ctgtggagaa	cctagagaca	accatgagat	3960
ccccggtgtt	cacggacaac	tctctccac	cagcagtgcc	ccagagcttc	caggtggccc	4020
acctgcatgc	tcccaccggc	agtggtaaga	gcaccaaggt	cccggctgcg	tacgcagccc	4080
agggtacaaa	ggtgttggtg	ctcaaccctt	ctgttgctgc	aacgctgggc	tttgggtgct	4140
acatgtccaa	ggcccatggg	gtcgtacctt	atatcaggac	cgggggtgaga	acaattacca	4200
ctggcagccc	catcacgtac	tccacctacg	gcaagttcct	tgccgacggc	gggtgctcag	4260
gaggcgctta	tgacataata	atttgtgacg	agtgccactc	cacggatgcc	acatccatct	4320
tgggcacatg	cactgtcctt	gaccaagcag	agactgcggg	ggcgagattg	gttgtgctcg	4380
ccactgctac	ccctccgggc	tccgtcactg	tgtcccatcc	taacatcgag	gaggttgctc	4440
tgtccaccac	cggagagatc	cctttctacg	gcaaggctat	ccccctcgag	gtgatcaagg	4500
ggggaagaca	tctcatcttc	tgtcactcaa	agaagaagtg	cgacgagctc	gccgcgaagc	4560
tggtgcatt	gggcatcaat	gccgtggcct	actaccgcgg	acttgacgtg	tctgtcatcc	4620
cgaccagcgg	cgatgttgtc	gtcgtgtcga	ccgatgctct	catgactggc	tttaccgcgc	4680
acttgcactc	tgtgatagac	tgcaaacacgt	gtgtcactca	gacagtcgat	ttcagccttg	4740
acctacctt	taccattgag	acaaccacgc	tccccagga	tgtgtctctc	aggactcagc	4800
gccggggcag	gactggcagg	gggaagccag	gcactctacg	atttgtggca	ccgggggagc	4860
gcccctccgg	catgttcgac	tctgtccgtcc	tctgtgagtg	ctatgacgcg	ggctgtgctt	4920
ggtatgagct	catgcccgcc	gagactacag	ttaggctacg	agcgtacatg	aacaccccg	4980
ggcttcccgt	gtgccaggac	catcttgaat	tttgggaggg	cgtctttacg	ggcctcacc	5040
atatagatgc	ccactttcta	tcccagacaa	agcagagtgg	ggagaacttt	ccttacctgg	5100
tagcgtacca	agccaccgtg	tgcgtaggg	ctcaagcccc	tccccatcg	tgggaccaga	5160
tgtggaagtg	tttgatccgc	cttaaaccct	ccctccatgg	gccaacaccc	ctgctataca	5220
gactgggcgc	tgttcagaat	gaagtacccc	tgacgcaccc	aatcaccaaa	tacatcatga	5280
catgcatgtc	ggccgacctg	gaggtcgtca	cgagcacctg	ggtgctcgtt	ggcggcgtcc	5340
tggctgctct	ggccgcgtat	tgcctgtcaa	caggctgcgt	ggtcatagt	ggcaggattg	5400
tcttgtccgg	gaagccggca	attatacctg	acagggaggt	tctctaccag	gagttcgatg	5460
agatggaaga	gtgctctcag	cacttacctg	acatcgagca	agggatgatg	ctcgctgagc	5520
agttcaagca	gaaggccctc	ggcctcctgc	agaccgcgtc	ccgcatgca	gaggttatca	5580
ccccgtctgt	ccagaccaac	tggcagaac	tgcaggtcct	ctgggcgaag	cacatgtgga	5640
atttcatcag	tgggatacaa	tatttggcgg	gcctgtcaac	gctgcctgg	aaccccgcca	5700
ttgcttcatt	tggtgctttt	acagctgcgc	tcaccagccc	actaaccact	ggccaaaccc	5760
tctcttcaa	catattgggg	gggtgggtgg	ctgcccagct	cgccgcccc	ggtgccgcta	5820
ccgcctttgt	gggcgctggc	ttagctggcg	ccgccatcgg	cagcgttgg	ctggggaagg	5880
tctcgtgga	cattcttgca	gggtatggcg	cgggcgtggc	gggagctctt	gtagcattca	5940
agatcatgag	cggtgaggtc	ccctccacgg	aggacctgg	caatctgcta	cccgccatcc	6000
tctgcgctgg	agcccttgta	gtcgggtgtg	tctgcgcagc	aatactgcgc	cggcacgttg	6060

gcccggggcga	gggggcagtg	caatggatga	accgggcta	agccttcgcc	tcccggggga	6120
accatgtttc	ccccacgcac	tacgtgccc	agagcgatgc	agccgcccgc	gtcactgcca	6180
tactcagcag	cctcactgta	acccagctcc	tgaggcgact	acatcagtg	ataaggtcgg	6240
agtgtaccac	tccatgctcc	ggctcctggc	taagggacat	ctgggactgg	atatgdcagg	6300
tgctgagcga	ctttaagacc	tggtgaaag	ccaagctcat	gccacaactg	cctgggattc	6360
cctttgtgtc	ctgccagcgc	gggtataggg	gggtctggcg	aggagacggc	attatgcaca	6420
ctcgctgcca	ctgtggagct	gagatcactg	gacatgtcaa	aaacgggacg	atgaggatcg	6480
tcggtcctag	gacctgcagg	aacatgtgga	gtgggacgtt	ccccattaac	gcctacacca	6540
cgggcccctg	tactcccctt	cctgcgccga	actataagtt	cgcgctgtgg	aggggtgtctg	6600
cagaggaata	cgtggagata	aggcggtgg	gggacttcca	ctacgtatcg	ggtatgacta	6660
ctgacaatct	taaatgccc	tgccagatcc	catcgcccga	atttttcaca	gaattggacg	6720
gggtgcgct	acataggtt	gcgcccctt	gcaagccctt	gctgcgggag	gaggtatcat	6780
tcagagtagg	actccacgag	taccgggtgg	ggtcgcaatt	accttgcgag	cccgaaccgg	6840
acgtagccgt	gttgacgtcc	atgctcactg	atccctccca	tataacagca	gaggcgcccg	6900
ggagaagggt	ggcgagaggg	tcaccccctt	ctatggccag	ctcctcgccc	agccagctgt	6960
ccgctccatc	tctcaaggca	acttgaccg	ccaaccatga	ctcccctgac	gccgagctca	7020
tagaggctaa	cctcctgtgg	aggcaggaga	tggcgggcaa	catcaccagg	gttgagtca	7080
agaacaaagt	ggtgattctg	gactccttcg	atccgcttgt	ggcagaggag	gatgagcggg	7140
aggtctccgt	acccgcagaa	attctgcgga	agtctcggag	attcgcccgg	gccctgccc	7200
tttgggcg	gccggactac	aacccccgc	tagtagagac	gtggaaaaag	cctgactacg	7260
aaccacctgt	ggtccatggc	tgcccgttac	cactctcacg	gtcccctcct	gtgcctccgc	7320
ctcgaaaaaa	gcgtacggtg	gtcctcaccg	aatcaaccct	acctactgcc	ttggccgagc	7380
ttgccaccaa	aagttttggc	agctcctcaa	cttcggcat	tacgggcgac	aatatgacaa	7440
catcctctga	gcccgcctt	tctggctgcc	cccccgactc	cgacgttgag	tcctattctt	7500
ccatgcccc	cctggagggg	gagcctgggg	atccggattt	cagcgacggg	tcctggtcga	7560
cggtcagtag	tggggccgac	acggaagatg	tcgtgtgctg	ctcaatgtct	tatacctgga	7620
caggcgcact	cgtcacccc	tgcgctgcgg	aagaacaaaa	actgcccac	aacgcactga	7680
gcaactcggt	gctacgccat	cacaatctgg	tatatccac	cacttcacgc	agtgtctgcc	7740
aaaggcagaa	gaaagtccca	tttgacagac	tgcaagttct	ggacagccat	taccagagcg	7800
tgctcaagga	ggtcaaagca	gcggcgtaaa	aagtgaaggc	taacttgcta	tccgtagagg	7860
aagcttgtag	cctgacgccc	ccacattcag	ccaaatccaa	gtttggctat	ggggcaaaa	7920
acgtccgttg	ccatgccaga	aaggccgtag	cccacatcaa	ctccgtgtgg	aaagaccttc	7980
tggaagacag	tgtaacacca	atagacacta	tcctcatggc	caagaacgag	gtcttctgcg	8040
ttcagcctga	gaaggggggt	cgtaagccag	ctcgctcat	cgtgttcccc	gacctggg	8100
tgcgcggtg	cgagaagatg	gccctgtacg	acgtgggttag	caaactcccc	ctggccgtga	8160
tggaagctc	ctacggattc	caatactcac	caggacagcg	ggttgaaatc	ctcgtgcaag	8220
cgtggaagtc	caagaagacc	ccgatgggg	tcccgtatga	taccgctgt	tttgactcca	8280
cagtcactga	gagcgacatc	cgtagcgagg	aggcaattta	ccaatgttgt	gacctggacc	8340
cccaagcccc	cgtggccatc	aagtccctca	ctgagaggct	ttatgttggg	ggccctctta	8400
ccaattcaag	gggggaaaa	tgcggtatc	gcaggtgccg	cgcgagcggc	gtactgacaa	8460
ctagctgtgg	taacaccctc	acttgctaca	tcaaggccc	ggcagcccgt	cgagccgcag	8520
ggctccagga	ctgcaccatg	ctcggtgtg	gcgacgactt	agtcgttatc	tgtgaaagt	8580
cgggggtcca	ggaggacgcg	gcgagcctga	gagcctttac	ggaggctatg	accaggtact	8640
ccgccccccc	cggggacccc	ccacaaccag	aatacgactt	ggagcttata	acatcatgct	8700
cctccaacgt	gtcagtcgcc	cacgacggcg	ctggaaaaag	ggtctactac	cttaccgctg	8760
accctacaac	ccccctcgcg	agagccgctg	gggagacagc	aagacacact	ccagtcaatt	8820
cctggctagg	caacataatc	atgtttgccc	ccacactgtg	ggcgaggatg	atactgatga	8880
cccatttctt	tagcgtcctc	atagccagg	atcagcttga	acaggctctt	aactgtgaga	8940
tctacgcagc	ctgctactcc	atagaaccac	tggtctacc	tccaatcatt	caaagactcc	9000
atggcctcag	cgcattttca	ctccacagtt	actctccagg	tgaagtcaat	aggggtggccg	9060
catgcctcag	aaaacttggg	gtcccgcctt	tgcgagcttg	gagacaccgg	gcccggagcg	9120
tccgcgctag	gcttctgtcc	aggggaggca	gggtgccc	atgtggcaag	tacctcttca	9180
actgggcagt	agaacaaa	ctcaaatca	ctccaatagc	ggcgctggc	cggctggact	9240
tgtccgggtg	gttcacggct	ggctacagcg	ggggagacat	ttatcacagc	gtgtctcatg	9300
ccgggcccc	ctggttctg	ttttgcttac	tctgtctcgc	tgagggggta	ggcatctacc	9360
tctcccccaa	ccgggtgaagg	ttggggtaaa	cactccggcc	tcttaggcca	tttccctttt	9420
tttttttttt	tttttttttc	cctttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	9480
tctttttcct	tcttttttcc	ctttctcttc	ctcccttctt	taatggtggc	tccatcttag	9540
ccctagtcac	ggctagctgt	gaaaggtccg	tgagccgc	gactgcagag	agtgtgata	9600
ctggcctctc	tgcatatcat	gt				9622

<210> 3  
<211> 8451  
<212> ADN  
<213> séquence artificielle

<220>

<223> réplicon obtenu par fusion d'un gène de résistance  
à l'hygromycine B avec la séquence SEQ ID NO : 1

<400> 3

gccagccccc	tgatgggggc	gacactccac	catagatcac	tcccctgtga	ggaactactg	60
tcttcacgca	gaaagcgtct	agccatggcg	ttagtatgag	tgtcgtgcag	cctccaggac	120
ccccctccc	gggagagcca	tagtggtctg	cggaaccggg	gagtacaccg	gaattgccag	180
gacgaccggg	tcctttcttg	gataaaccgg	ctcaatgcct	ggagatttgg	gcgtgcccc	240
gcaagactgc	tagccgagta	gtgttgggtc	gcgaaaggcc	ttgtgggtact	gcctgatagg	300
gtgcttgcca	gtgccccggg	aggtctcgta	gaccgtgcac	catgagcacg	aatcctaacc	360
ctcaaagaaa	aaccaaacgt	aacaccaacc	gtcgcccaca	ggacgtcgag	ttcccgggtg	420
gcggtcagat	cgttggtgga	gtttacttgt	tgccgcgcag	gggccctaga	ttgggtgtgc	480
gcgcgacgag	gaagacttcc	gagcggtcgc	aacctcgtgg	tagacgtcag	cctatcccca	540
aggcacgtcg	gcccgagggc	aggacctggg	ctcagcccg	gtaccctatg	aaaaagcctg	600
aactcaccgc	gacgtctgtc	gagaagtctc	tgatcgaaaa	gttcgacagc	gtctccgacc	660
tgatgcagct	ctcggagggc	gaagaatctc	gtgctttcag	cttcgatgta	ggagggcggtg	720
gatatgtcct	gcgggtaaat	agctgcgcgc	atggtttcta	caaagatcgt	tatgtttatc	780
ggcactttgc	atcgcccgcg	ctcccgatct	cggaggtgct	tgacattggg	gaattcagcg	840
agagcctgac	ctattgcatc	tcccgcctg	cacagggtgt	cacgttgcaa	gacctgcctg	900
aaaccgaact	gcccgtgtgt	ctgcagccgg	tcgcggaggc	catggatgcg	atcgctgcgg	960
ccgatcttag	ccagacgagc	gggttcggcc	cattcggacc	gcaaggaatc	gggtcaataca	1020
ctacatggcg	tgatttcata	tgccgcgattg	ctgatcccca	tgtgtatcac	tggcaaacgtg	1080
tgatggacga	caccgtcagt	gcgtccgtcg	cgcaggctct	cgatgagctg	atgctttggg	1140
ccgaggactg	ccccgaagtc	cggcacctcg	tgcacgcgga	tttcggctcc	aacaattgtcc	1200
tgacggacaa	tggccgcata	acagcgggtca	ttgactggag	cgaggcgatg	ttcggggatt	1260
cccaatacga	ggtcgccaac	atcttcttct	ggaggccgtg	gttggcttgt	atggagcagc	1320
agacgcgcta	cttcgagcgg	aggcatccgg	agcttgacgg	atcgcccgcg	ctccgggcgt	1380
atatgtctcc	cattggtcct	gaccaactct	atcagagctt	gggtgacggc	aatttcgatg	1440
atgcagcttg	ggcgcagggt	cgatgcgacg	caatcgtccg	atccggagcc	gggactgtcg	1500
ggcgtacaca	aatcgcccgc	agaagcgcg	ccgtctggac	cgatggctgt	gtagaagtac	1560
tcgccgatag	tggaaaccga	cgccccagca	ctcgtgggga	tcgggagatg	ggggaggcta	1620
actctagtct	ggacacggag	gtggccgcgt	cgtgtggcgg	cgttgttctt	gtcgggttaa	1680
tggcgctgac	tctgtcacca	tattacaagc	gctatatcag	ctgggtcatg	tgggtggcttc	1740
agtattttct	gaccagagta	gaagcgcaac	tgcacgtgtg	ggttcccccc	ctcaacgtcc	1800
ggggggggcg	cgatgccgtc	atcttactca	tgtgtgttgt	acaccgcact	ctggtatattg	1860
acatcaccaa	actactcctg	gccatcttcg	gacccctttg	gattcttcaa	gccagtttgt	1920
ttaaagtccc	ctacttcgtg	cgcgttcaag	gccttctccg	gatctgcgcg	ctagcgcgga	1980
agatgaccgg	aggtcattac	gtgcaaattg	ccatcatcaa	gttggggggc	cttactggca	2040
cctatgtgta	taaccatctc	acccctcttc	gagactgggc	gcacaacggc	ctgcgagatc	2100
tggccgtggc	tgtggaacca	gtcgtcttct	cccgaatgga	gaccaagctc	atcacgtggg	2160
gggcagatac	cgccgcgtgc	ggtgacatca	tcaacgcgtt	gcccgtctct	gcccgtaggg	2220
gccaggagat	actgcttggg	ccagccgacg	gaatggtctc	caaggggtgg	agggtgctgg	2280
cgcccatcac	ggcgtacgcc	cagcagacga	gaggcctcct	agggtgtata	atcaccagcc	2340
tgactggccg	ggacaaaaac	caagtggagg	gtgaggtcca	gatcgtgtca	actgctaccc	2400
aaaaccttct	ggcaacgtgc	atcaatgggg	tatgctggac	tgtctaccac	ggggccggaa	2460
cgaggaccat	cgcatacccc	aagggtcctg	tcatccagat	gtataccaat	gtggaccaag	2520
accttggtgg	ctggcccgcct	cctcaagggt	cccgtcatt	gacaccctgc	acctgcggct	2580
cctcggacct	ttacctggtc	acgaggcacg	ccgacgtcat	tcccgtgcgc	cggcgagggtg	2640
atagcagggg	tagcctgctt	ttgccccggc	ccatttctta	cctaaaaggc	tcctcggggg	2700
gtccgtgtgt	gtgccccggc	ggacacgcgc	tgggcttatt	cagggccgcg	gtgtgcaccc	2760
gtggagtggt	caaggcgggtg	gactttatcc	ctgtggagaa	cctagagaca	accatgagat	2820
ccccggtgtt	cacggacaac	tcctctccac	cagcagtgcc	ccagagcttc	caggtggccc	2880
acctgcatgc	tcccacgcgc	agtggtaaga	gcaccaagggt	cccggctgcg	tacgcagccc	2940
agggctacaa	ggtgttggtg	ctcaaccctt	ctgttgctgc	aacgctgggc	tttgggtgctt	3000
acatgtccaa	ggcccatggg	gtcgtatccta	atatcaggac	cgggggtgaga	acaattacca	3060

ctggcagccc	catcacgtac	tccacctacg	gcaagttcct	tgccgacggc	gggtgctcag	3120
gaggcgctta	tgacataata	atthgtgacg	agtgccactc	cacggatgcc	acatccatct	3180
tgggcatcgg	cactgtcctt	gaccaagcag	agactgcggg	ggcgagattg	gttgtgctcg	3240
ccactgctac	ccctccgggc	tccgtcactg	tgtcccattc	taacatcgag	gaggttgctc	3300
tgtccaccac	cggagagatc	cctttctacg	gcaaggctat	ccccctcgag	gtgatcaagg	3360
ggggaagaca	tctcatcttc	tgtcactcaa	agaagaagtg	cgacgagctc	gccgcgaagc	3420
tggtcgcat	gggcatcaat	gccgtggcct	actaccgagg	acttgacgtg	tctgtcatcc	3480
cgaccagcgg	cgatgttgct	gtcgtgtcga	ccgatgctct	catgactggc	tttaccggcg	3540
acttcgactc	tgtgatagac	tgcaaacacgt	gtgtcactca	gacagtcgat	ttcagccttg	3600
accctacctt	taccattgag	acaaccacgc	tccccagga	tgtgtgtctc	aggactcagc	3660
gccggggcag	gactggcagg	gggaagccag	gcatctacag	atthgtggca	ccgggggagc	3720
gcccctccgg	catgttcgac	tctgtcgtcc	tctgtgagtg	ctatgacggc	ggctgtgctt	3780
ggatgagct	catgcccggc	gagactacag	ttaggctacg	agcgtacatg	aacaccccg	3840
ggcttcccgt	gtgccaggac	catcttgaat	tttgggagg	cgtctttacg	ggcctcacc	3900
atatagatgc	ccactttcta	tcccagacaa	agcagagtgg	ggagaacttt	ccttacctgg	3960
tagcgtacca	agccaccgtg	tgcgttaggg	ctcaagcccc	tcccccatcg	tgggaccaga	4020
tgtggaagt	tttgatccgc	cttaaaccga	ccctccatgg	gccaacaccc	ctgctatata	4080
gactgggcgc	tgttcagaat	gaagtcaccc	tgacgcaccc	aatcaccaaa	tacatcatga	4140
catgcatgtc	ggccgacctg	gaggtcgtca	cgagcacctg	gggtgctcgt	ggcggcgtcc	4200
tggctgctct	ggccgcgtat	tgcctgtcaa	caggctgcgt	gggtcatagt	ggcaggattg	4260
tcttgtccgg	gaagccggca	attatacctg	acagggaggt	tctctaccag	gagttcgatg	4320
agatggaaga	gtgctctcag	cacttacctg	acatcgagca	agggatgatg	ctcgctgagc	4380
agttcaagca	gaaggccctc	ggcctcctgc	agaccgcgtc	ccgccatgca	gaggttatca	4440
ccccgtctgt	ccagaccaac	tggcagaaac	tgcaggtctt	ctgggcgaag	cacatgtgga	4500
atttcacgat	tgggatacaa	tatttggcgg	gcctgtcaac	gctgcctggg	aaccccgcca	4560
ttgcttcatt	gatggctttt	acagctgcgg	tcaccagccc	actaaccact	ggccaaaccc	4620
tcctcttcaa	catattgggg	gggtgggtgg	ctgccagct	cgccgcccc	gggtccgcta	4680
ccgcctttgt	gggcgctggc	ttagctggcg	ccgccatcgg	cagcgttgga	ctggggaagg	4740
tcctcgtgga	cattcttgca	gggtatggcg	cgggcgtggc	gggagctctt	gtagcattca	4800
agatcatgag	cggtgaggtc	ccctccacgg	aggacctggg	caatctgcta	cccgccatcc	4860
tctcgctgg	agcccttgta	gtcgggtgtg	tctgcgcagc	aatactgcgc	cggcacgttg	4920
gcccgggcga	gggggcagtg	caatggatga	accggcta	agccttcgcc	tcccggggga	4980
accatgtttc	ccccacgcac	tacgtgccgg	agagcgatgc	agccgcccgc	gtcactgcc	5040
tactcagcag	accagctgta	accagctcc	tgaggcgact	acatcagtg	ataagctagg	5100
agtgtaccac	tccatgctcc	ggctcctggc	taaggacat	ctgggactgg	atatgcgagg	5160
tgctgagcga	ctttaagacc	tggctgaaag	ccaagctcat	gccacaactg	cctgggattc	5220
cctttgtgtc	ctgccagcgc	gggtatagg	gggtctggcg	aggagacggc	attatgcaca	5280
ctcgctgcca	ctgtggagct	gagatcactg	gacatgtcaa	aaacgggacg	atgaggatcg	5340
tcggtcctag	gacctgcagg	aacatgtgga	gtgggacgtt	ccccattaac	gcctacacca	5400
cgggcccctg	tactcccctt	cctgcgccga	actataagtt	cgcgctgtgg	aggtgtctg	5460
cagaggaata	cgtggagata	aggcggtgg	gggacttcca	ctacgtatcg	ggtatgacta	5520
ctgacaactc	taaatgccc	tgccagatcc	catcgcccga	atthttcaca	gaattggacg	5580
gggtgcgcct	acataggttt	gcgcccctt	gcaagccctt	gctgcgggag	gaggtatcat	5640
tcagagtagg	actccacgag	taccgggtgg	ggctgcgaat	accttgcgag	cccgaaacgg	5700
acgtagccgt	gttgacgtcc	atgctcactg	atccctccca	tataacagca	gaggcggccg	5760
ggagaaggtt	ggcgagagg	tcaccccctt	ctatggccag	ctcctcgcc	agccagctgt	5820
ccgctccatc	tctcaaggca	acttgcaccg	ccaaccatga	ctcccctgac	gccgagctca	5880
tagaggctaa	cctcctgtgg	aggcaggaga	tgggcggcaa	catcaccagg	gttgagtcag	5940
agaacaaagt	ggtgattctg	gactccttcg	atccgcttgt	ggcagaggag	gatgagcggg	6000
aggtctccgt	acccgcagaa	attctgcgga	agtctcggag	attcgcccgg	gccctgccc	6060
tttgggcgg	gcccgcactac	aaccccgc	tagtagagac	gtggaaaaag	cctgactacg	6120
aaccactctg	ggctccatgg	tgcccgttac	gacctccacg	gtcccctcct	gtgcctccgc	6180
ctcggaaaaa	gcgtacgggt	gtcctcaccg	aatcaaccct	acctaactgc	ttggccgagc	6240
ttgccaccaa	aagtthttgg	agctcctcaa	cttcggcat	tacgggcgac	aatatgacaa	6300
catcctctga	gcccgcctct	tctggctgcc	cccccgactc	cgacgttgag	tcctattctt	6360
ccatgcccc	cctggagggg	gagcctgggg	atccggattt	cagcgacggg	tcattggtcga	6420
cggtcagtag	tggggccgac	acggaagatg	tctgtgtctg	ctcaatgtct	tatacctgga	6480
caggcgcact	cgtcaccctg	tgcgctgcgg	aagaacaaaa	actgcccctc	aacgcactga	6540
gcaactcgtt	gtacgccaat	cacaatctgg	tatattccac	cacttcaagc	agtgttggc	6600
aaaggcagaa	gaaagtcaca	tttgacagac	tgcaagttct	ggacagccat	taccaggacg	6660
tgctcaagga	ggtcaaagca	gcggcgtcaa	aagtgaaggc	taacttgcta	tccgtagagg	6720

aagcttgacg	cctgacgccc	ccacattcag	ccaaatccaa	gtttggctat	ggggcaaaag	6780
acgtccgttg	ccatgccaga	aaggccgtag	cccacatcaa	ctccgtgtgg	aaagaccttc	6840
tggaagacag	tgtaacacca	atagacacta	tcatcatggc	caagaacgag	gtcttctgcg	6900
ttcagcctga	gaaggggggt	cgtaagccag	ctcgtctcat	cgtgttcccc	gacctgggcg	6960
tgcgcggtg	cgagaagatg	gccctgtacg	acgtggttag	caaactcccc	ctggccgtga	7020
tggaagctc	ctacggattc	caatactcac	caggacagcg	ggttgaattc	ctcgtgcaag	7080
cgtggaagtc	caagaagacc	ccgatggggt	tcccgtatga	taccgctgt	tttgactcca	7140
cagtcactga	gagcgacatc	cgtacggagg	aggcaattta	ccaatgttgt	gacctggacc	7200
cccaagccc	cgtggccatc	aagtcctca	ctgagaggct	ttatgttggg	ggccctctta	7260
ccaattcaag	gggggaaaac	tgcggtctatc	gcaggtgccg	cgcgagcggc	gtactgacaa	7320
ctagctgtgg	taacaccctc	acttgctaca	tcaaggccc	ggcagcccg	cgagccgag	7380
ggctccagga	ctgcaccatg	ctcgtgtgtg	gcgacgactt	agtcgttata	tgtgaaagt	7440
cgggggtcca	ggaggacg	gcgagcctga	gagcctttac	ggaggctatg	accaggtact	7500
cgccccccc	cggggacccc	ccacaaccag	aatacgactt	ggagcttata	acatcatgct	7560
cctccaacgt	gtcagtcgcc	cacgacggcg	ctggaaaaag	ggtctactac	cttaccgctg	7620
accctacaac	ccccctcg	agagccgcgt	gggagacagc	aagacacact	ccagtcaatt	7680
cctggctagg	caacataatc	atgtttgccc	ccacactgtg	ggcgaggatg	atactgatga	7740
cccatttctt	tagcgtcctc	atagccagg	atcagcttga	acaggtctt	aactgtgaga	7800
tctacgcagc	ctgctactcc	atagaaccac	tggatctacc	tccaatcatt	caaagactcc	7860
atggcctcag	cgcattttca	ctccacagtt	actctccagg	tgaagtcaat	agggtggccg	7920
catgcctcag	aaaacttggg	gtcccgcct	tgcgagcttg	gagacaccg	gcccggagcg	7980
tccgcgctag	gcttctgtcc	aggggaggca	gggctgccat	atgtggcaag	tacctcttca	8040
actgggcagt	aagaacaaag	ctcaaactca	ctccaatagc	ggcgctggc	cggtctgact	8100
tgccgggtg	gttcacggct	ggctacagcg	ggggagacat	ttatcacagc	gtgtctcatg	8160
cccggcccc	ctggttctgg	ttttgcctac	tcctgctcgc	tcaggggta	ggcatctacc	8220
tcctcccaa	cgggtgacat	ttccctttt	ttttttttt	tttttttcc	ctttttttt	8280
ttttttttt	ttttttttt	ttttttttt	ccttttcctt	cttttttcc	ttctcttcc	8340
tccttcttt	aatggtggct	ccatcttagc	cctagtcacg	gctagctgtg	aaaggtccgt	8400
gagccgcatg	actgcagaga	gtgctgatac	tggcctctct	gcagatcatg	t	8451

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 novembre 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/088338 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 7/00,  
C07K 14/18

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01422

(22) Date de dépôt international : 25 avril 2002 (25.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/05732 27 avril 2001 (27.04.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cédex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
WYCHOWSKI, Czeslaw [FR/FR]; 4, rue de la Rigole  
du Roy, Résidence les Près, F-62410 Meurchin (FR).  
DUVERLIE, Gilles [FR/FR]; 458, rue Saint-Fuscien,  
F-80090 Amiens (FR). DUBUISSON, Jean [BE/FR];  
80, avenue de Verdun, F-59155 Faches-Thumesnil (FR).  
PILLEZ, André [FR/FR]; 281/37, rue Solférino, F-59000  
Lille (FR).

(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Gros-  
set-Fournier & Demachy Sarl, 20, rue de Maubeuge,  
F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 3 avril 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR REPLICATING THE HEPATITIS C VIRUS

(54) Titre : PROCEDE DE REPLICATION DU VIRUS DE L'HEPATITE C

(57) Abstract: The invention concerns the use of cells capable of carrying out a process of prenylation of proteins coded by the hepatitis C virus (HCV) genome, such as prenylation of the NS5A protein, for replicating and, if required, the production of HCV or derivative viable mutants, in a suitable culture medium.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de cellules capables d'effectuer un processus de prénylation de protéines codées par le génome du virus de l'hépatite C (VHC), telle que la prénylation de la protéine NS5A, pour la répllication et, le cas échéant, la production du VHC ou de mutants viables dérivés, dans un milieu de culture approprié.

WO 02/088338 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 02/01422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N7/00 C07K14/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, EMBASE, SCISEARCH, CHEM  
ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 127 116 A (RICE CHARLES M ET AL) 3 October 2000 (2000-10-03) column 33, line 47 -column 34, line 41 column 107 -column 115 ---	1-23
X	WO 96 24662 A (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE ;RAVAGNAN GIAMPIETRO (IT); BATTAGLIA) 15 August 1996 (1996-08-15) abstract page 6, line 20 - line 21; claims 1,7 --- -/-	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 2003

Date of mailing of the international search report

22/01/2003

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niemann, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In                      onal Application No  
PCT/FR 02/01422

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALLI M B ET AL: "HEPATITIS C VIRUS INFECTION OF A VERO CELL CLONE DISPLAYING EFFICIENT VIRUS-CELL BINDING" RESEARCH IN VIROLOGY, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 148, no. 2, March 1997 (1997-03), pages 181-186, XP000878532 ISSN: 0923-2516 the whole document	1-23
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 November 1994 (1994-11-10) page 7, line 29 -page 8, line 30	1-23
X	GERMI R ET AL: "Hepatitis C virus adsorption step study on different cell lines." TRAVAUX SCIENTIFIQUES DES CHERCHEURS DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES, no. 20, 1999, pages 55-56, XP001042364 ISSN: 0243-7473 the whole document	1-23
X	GERMI R ET AL: "Les systemes de culture du virus de l'hepatite C." PATHOLOGIE BIOLOGIE, vol. 49, no. 3, April 2001 (2001-04), pages 255-261, XP001042317 ISSN: 0369-8114 the whole document	1-23
A	US 6 159 939 A (GLENN JEFFREY) 12 December 2000 (2000-12-12) abstract	
A	EP 1 043 399 A (BARTENSCHLAGER RALF DR) 11 October 2000 (2000-10-11) cited in the application abstract	
A	BARTENSCHLAGER RALF ET AL: "Replication of hepatitis C virus." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 1631-1648, XP002186769 ISSN: 0022-1317 the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/FR 02/01422

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6127116	A	03-10-2000	US 5874565 A	23-02-1999
			AU 742175 B2	20-12-2001
			AU 6938698 A	22-09-1998
			BR 9808147 A	28-03-2000
			EP 1005366 A1	07-06-2000
			JP 2001515353 T	18-09-2001
			US 6392028 B1	21-05-2002
			WO 9839031 A1	11-09-1998
			US 2002102540 A1	01-08-2002
			ZA 9801838 A	19-02-1999
			AU 713112 B2	25-11-1999
			AU 6909796 A	19-03-1997
			BR 9610307 A	06-07-1999
			CA 2230452 A1	06-03-1997
			DE 69620432 D1	08-05-2002
			DE 69620432 T2	21-11-2002
			EP 0856051 A1	05-08-1998
			ES 2174097 T3	01-11-2002
			JP 11514214 T	07-12-1999
			PT 856051 T	30-09-2002
			WO 9708310 A1	06-03-1997
			US 6297003 B1	02-10-2001
WO 9624662	A	15-08-1996	WO 9624662 A1	15-08-1996
			AU 1822195 A	27-08-1996
WO 9425064	A	10-11-1994	AU 6943994 A	21-11-1994
			WO 9425064 A1	10-11-1994
US 6159939	A	12-12-2000	US 5876920 A	02-03-1999
EP 1043399	A	11-10-2000	DE 19915178 A1	05-10-2000
			AU 2518000 A	19-10-2000
			CA 2303526 A1	03-10-2000
			EP 1043399 A2	11-10-2000
			JP 2001017187 A	23-01-2001

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 02/01422

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIP 7 C12N7/00 C07K14/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIP 7 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, EMBASE, SCISEARCH, CHEM  
ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
X	US 6 127 116 A (RICE CHARLES M ET AL) 3 Octobre 2000 (03-10-2000) colonne 33, ligne 47 - colonne 34, ligne 41 colonne 107 - colonne 115	1-23
X	WO 96 24662 A (CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE ; RAVAGNAN GIAMPIETRO (IT); BATTAGLIA) 15 Aout 1996 (15-08-1996) abrégé page 6, ligne 20 - ligne 21; revendications 1,7	1-23

☐

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents.

☐

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe.

\* Catégories spéciales de documents cités :

"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais après la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée

10 Janvier 2003 (10.01.03)

Date d'expédition du rapport de recherche

22 Janvier 2003 (22.01.03)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

O.E.P.M

Fonctionnaire autorisé

n° de télécopieur

n° de téléphone

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 02/01422

C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n° des revendications visées
X	VALLI M B ET AL: "HEPATITIS C VIRUS INFECTION OF A VERO CELL CLONE DISPLAYING EFFICIENT VIRUS-CELL BINDING" RESEARCH IN VIROLOGY, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 148, no. 2, Mars 1997 (03-1997), pages 181-186, XP000878532 ISSN: 0923-2516 Le document en entier	1-23
X	WO 94 25064 A (US ARMY) 10 Novembre 1994 (10-11-1994) page 7, ligne 29 -page 8, ligne 30	1-23
X	GERMI R ET AL: "Hepatitis C virus adsorption step study on different cell lines." TRAVAUX SCIENTIFIQUES DES CHERCHEURS DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES, no. 20, 1999, pages 55-56, XP001042364 ISSN: 0243-7473 Le document en entier	1-23
X	GERMI R ET AL: "Les systemes de culture du virus de l'hepatite C." PATHOLOGIE BIOLOGIE, vol. 49, no. 3, Avril 2001 (04-2001), pages 255-261, XP001042317 ISSN: 0369-8114 Le document en entier	1-23
A	US 6 159 939 A (GLENN JEFFREY) 12 Decembre 2000 (12-12-2000) abrégé	
A	EP 1 043 399 A (BARTENSCHLAGER RALF DR) 11 Octobre 2000 (11-10-2000) cité dans la description abrégé	
A	BARTENSCHLAGER RALF ET AL: "Replication of hepatitis C virus." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 7, Juillet 2000 (07-2000), pages 1631-1648, XP002186769 ISSN: 0022-1317 Le document en entier	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01422

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6127116 A	03-10-2000	US 5874565 A	23-02-1999
		AU 742175 B2	20-12-2001
		AU 6938698 A	22-09-1998
		BR 9808147 A	28-03-2000
		EP 1005366 A1	07-06-2000
		JP 2001515353 T	18-09-2001
		US 6392028 B1	21-05-2002
		WO 9839031 A1	11-09-1998
		US 2002102540 A1	01-08-2002
		ZA 9801838 A	19-02-1999
		AU 713112 B2	25-11-1999
		AU 6909796 A	19-03-1997
		BR 9610307 A	06-07-1999
		CA 2230452 A1	06-03-1997
		DE 69620432 D1	08-05-2002
		DE 69620432 T2	21-11-2002
		EP 0856051 A1	05-08-1998
		ES 2174097 T3	01-11-2002
		JP 11514214 T	07-12-1999
		PT 856051 T	30-09-2002
		WO 9708310 A1	06-03-1997
		US 6297003 B1	02-10-2001
WO 9624662 A	15-08-1996	WO 9624662 A1	15-08-1996
		AU 1822195 A	27-08-1996
WO 9425064 A	10-11-1994	AU 6943994 A	21-11-1994
		WO 9425064 A1	10-11-1994
US 6159939 A	12-12-2000	US 5876920 A	02-03-1999
EP 1043399 A	11-10-2000	DE 19915178 A1	05-10-2000
		AU 2518000 A	19-10-2000
		CA 2303526 A1	03-10-2000
		EP 1043399 A2	11-10-2000
		JP 2001017187 A	23-01-2001

**THIS PAGE BLANK** (USPTO)